

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentlichem Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Studien zur Tenazität und Inaktivierung von ECHO-Viren  
und aviären Influenzaviren in Rohwürsten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Juliane Straube  
aus Freiberg

Leipzig, 2009

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Arwid Dauschies

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches  
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Günter Klein, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit,  
Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 20.10.2009

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1	Lebensmittelassoziierte Viren.....	3
2.1.1	Begriff und Vertreter.....	3
2.1.2	Kontamination von Lebensmitteln und Nachweis der Viren .....	6
2.1.3	Zoonotisches Potential.....	8
2.2	Humane Enteroviren - ECHO-Virus.....	10
2.2.1	Taxonomie .....	10
2.2.2	Virusaufbau.....	10
2.2.3	Pathogenese.....	11
2.2.4	Wirtsspektrum .....	12
2.2.5	Epidemiologie und Klinik.....	12
2.2.6	Tenazität und Vorkommen in Lebensmitteln .....	14
2.2.7	Infektionsgefahr durch Enteroviren in Lebensmitteln .....	16
2.3	Aviäre Influenzaviren.....	17
2.3.1	Taxonomie und Nomenklatur .....	17
2.3.2	Aufbau von Influenza A-Viren.....	17
2.3.3	Pathogenese.....	19
2.3.4	Wirtsspektrum .....	19
2.3.5	Klinische Erscheinungen bei Vogel und Mensch.....	20
2.3.6	Epidemiologie.....	21
2.3.7	Aviäre Influenzaviren als Zoonoseerreger.....	21
2.3.8	Infektionsgefahr durch Verzehr kontaminierter Geflügelprodukte .....	24
2.3.9	Tenazität .....	25
2.4	Rohwurst .....	28
2.4.1	Begriff.....	28
2.4.2	Herstellung .....	29
2.4.3	Reifung.....	30
2.4.4	Keimflora .....	31
2.5	Arbeitsplan .....	32

<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>33</b>
3.1	Material .....	33
3.1.1	Modellviren.....	33
3.1.2	Zellen .....	33
3.1.3	Bruteier.....	33
3.1.4	Rohmaterial zur Herstellung von Rohwürsten .....	33
3.1.5	Geräte, Laborbedarf, Reagenzien etc. ....	34
3.2	Methoden .....	35
3.2.1	Zellkultur BGM .....	35
3.2.2	Vermehrung von ECHO-Virus .....	35
3.2.3	Bestimmung des Infektiositätstiter.....	36
3.2.4	Vermehrung, Nachweis und Titration von Influenzaviren .....	36
3.2.5	Real time RT-PCR .....	38
3.2.6	Untersuchungen.....	39
3.2.6.1	Untersuchungen <i>in vitro</i> .. ....	40
3.2.6.2	Untersuchungen in Rohwürsten.....	41
3.2.6.2.1	Herstellung experimentell kontaminierter Rohwürste.....	41
3.2.6.2.2	Reifung und Lagerung der Rohwürste.....	43
3.2.6.2.3	Probennahme/ Beprobung von Rohwurst.....	45
3.2.6.2.4	Mikrobiologische Untersuchung der Wurstproben.....	46
3.2.6.2.5	Chemisch-physikalische und chemische Untersuchung der Würste....	46
3.2.7	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
4.1	Virusnachweis mittels BGM-Zellkultur .....	49
4.2	Virusnachweis im Brutei .....	49
4.3	<i>In vitro</i> -Versuchsreihen .....	49
4.3.1	Einfluss von Natriumchlorid und Natriumnitrit auf ECHO-Virus.....	49
4.3.2	Einfluss von D/L-Milchsäure auf ECHO-Virus .....	52
4.3.3	Vergleich der Versuchsreihen zum Einfluss von D/L- Milchsäure und Salzsäure auf ECHO-Virus.....	53
4.3.4	Versuchsreihen mit Influenzaviren .....	55
4.3.4.1	Einfluss von Natriumchlorid auf das Geflügelinfluenzavirus H3N8.....	55
4.3.4.2	Einfluss von D/L-Milchsäure auf das Geflügelinfluenzavirus H3N8.....	57

4.4	Ergebnisse der Versuchsreihen mit Rohwürsten.....	58
4.4.1	Hergestellte Produkte.....	58
4.4.2	Tenazität von ECHO-Virus in kurzgereiften Rohwürsten.....	60
4.4.3	Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste in .. Versuchsreihen mit ECHO-Virus.....	62
4.4.4	Tenazität von ECHO-Virus in langgereiften Rohwürsten .....	65
4.4.5	Ergebnisse der chemischen Untersuchung langgereifter Rohwürste in Versuchsreihen mit ECHO-Virus .....	67
4.4.6	Influenzaviren in kurzgereiften Rohwürsten .....	68
4.4.6.1	Tenazität von Influenzavirus H3N8.....	69
4.4.6.2	Tenazität von Influenzavirus H5N6.....	70
4.4.7	Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste in Versuchsreihen mit Influenzaviren.....	71
4.4.7.1	Influenzavirus H3N8.....	71
4.4.7.2	Influenzavirus H5N6.....	73
4.4.8	Ergebnisse der mittels real time RT-PCR untersuchten Wurstproben	74
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>77</b>
5.1	Ziel der Arbeit.....	77
5.2	Vorgehensweise.....	77
5.3	Versuchsaufbau .....	78
5.4	Ergebnisse .....	79
5.4.1	Nachweis der Viren mittels real time RT-PCR.....	79
5.4.2	Einfluss von Natriumchlorid und Natriumnitrit auf ECHO-Virus.....	79
5.4.3	Einfluss von D/L-Milchsäure auf ECHO-Virus .....	80
5.4.4	Versuchsreihen mit Rohwurst .....	82
5.4.4.1	Rohwurstprodukte.....	82
5.4.4.2	Methodik der experimentellen Rohwurstkontamination .....	83
5.4.5	Tenazität von ECHO-Virus in kurz- und langgereiften Rohwürsten ....	84
5.4.6	Einfluss von Natriumchlorid auf Geflügelinfluenzavirus H3N8.....	86
5.4.7	Einfluss von D/L-Milchsäure auf Geflügelinfluenzavirus H3N8.....	87
5.4.8	Tenazität der Influenzaviren in kurzgereiften Rohwürsten.....	88
5.4.9	Schlussfolgerung aus den beobachteten Ergebnissen mit ECHO-Virus . .....	90

## Inhaltsverzeichnis

5.4.10	Schlussfolgerungen aus den beobachteten Ergebnissen mit..... Influenzaviren.....	91
5.4.11	Temperatureffekt bei Viren.....	93
5.4.12	Abschließende Betrachtung .....	95
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>115</b>

Anhang

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Danksagung

**Abkürzungsverzeichnis**

AIV	Aviäres Influenzavirus
a <sub>w</sub> -Wert	Wasseraktivitätswert
BEFFE	Bindegewebsfreies Fleischeiweiß
BEFFE i. FE	Bindegewebsfreies Fleischeiweiß im Fleischeiweiß
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BGM	Buffalo Green Monkey cells
bp	base pairs
cpe	cytopathic effect
d	Tag
DHL	Desoxicholat-Hydrogen-Sulfide Agar
ECHO	Entero cythopathogenic human orphan virus
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. Coli</i>
EID <sub>50</sub>	Egg infectious dose 50 percent
EU	Europäische Union
FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich Löffler Institut
g	Gramm
GdL	Glucono-delta-Lacton
GKZ	Gesamtkeimzahl
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HA-Test	Hämagglutinationstest
HCl	Salzsäure
HEV	Humane Enteroviren
HPAI	high pathogenic avian influenza virus
ID	infektiöse Dosis
IE	Internationale Einheit(en)
KbE	Koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
LFGB	Lebensmittel-, Futtermittel- und Bedarfsgegenstände-Gesetzbuch

## Abkürzungsverzeichnis

log	Logarithmus
LPAI	low pathogenic avian influenza virus
ml	Milliliter
MDCK	Madin Darbey kidney cells
MKS	Maul- und Klauenseuche
MPa	Mega Pascal
MS	Milchsäure
MSB	Milchsäurebildner/ Milchsäure bildende Keime
MRS	Man-Rogosa-Sharpe Agar
NA	Neuraminidase
NaCl	Natriumchlorid
NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren
NPEV	Non-Polio-Enteroviruses
OIE	World Organistation for Animal Health
PC	Plate count Agar
PBS	Phosphat buffered saline
ppm	parts per million
RKI	Robert Koch-Institut
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
rpm	rounds per minute
TBE	Tick-borne encephalitis
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose 50 percent
Temp.	Temperatur
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 1 Einleitung

In den vergangenen Jahren wurde ein Anstieg der Anzahl infektiöser Gastroenteritiden beobachtet, welche durch Viren hervorgerufen wurden. So treten mittlerweile bei den meldepflichtigen infektiösen Darmerkrankungen Viren häufiger als Auslöser in Erscheinung als bakterielle Erreger.

In vielen Fällen ließen sich Infektionen auf den Verzehr kontaminierter Lebensmittel zurückführen. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff der sogenannten „food borne viruses“ geprägt. Vor allem Produkte, die zum Rohverzehr bestimmt sind, können als Infektionsquelle lebensmittelassoziierter Virusinfektionen dienen. Häufig werden in diesem Zusammenhang Muscheln, Salate, Gemüse, Obst als auch Eiswürfel oder Wasser genannt.

Zu Produkten, die ohne eine Hitzebehandlung zum Rohverzehr gelangen, gehören auch Rohfleischerzeugnisse wie Rohwürste. Diese sind im Zusammenhang mit bakteriellen Lebensmittelinfektionen wie beispielsweise Salmonellen, Listerien oder *Staphylococcus aureus* als Risikoprodukte bekannt. Die aktuellen Hygienerichtlinien und betrieblichen HACCP-Konzepte (hazard analysis critical control point) für biologische Gefahren in Rohwurstprodukten wurden in erster Linie für bakterielle Erreger erarbeitet. In welchem Ausmaß Rohwurstprodukte eine Rolle bei der Übertragung lebensmittelassoziierter Viren spielen, ist bisher kaum untersucht. Ebenso wenig ist zur Tenazität lebensmittelrelevanter Viren in Rohwurstprodukten und zum Einfluss technologischer Prozesse auf deren Inaktivierung bekannt.

Der Eintrag von Viren in Lebensmittel erfolgt zumeist über eine sekundäre Kontamination während der Herstellung oder Zubereitung von Speisen. In Zusammenhang mit der Herstellung von Rohwürsten ist ebenso ein primärer Eintrag von Viren über das verwendete Rohfleisch möglich. Dabei sind insbesondere Viren mit Zoonosepotential von Bedeutung. So besteht für animale Rotaviren der Verdacht, dass diese auch beim Menschen Infektionen auslösen können. Ebenso wird ein Zoonosepotential für Noroviren von Schwein und Rind diskutiert. Vor dem Hintergrund der aktuellen Ausbreitung des Geflügelinfluenzavirus H5N1 stellt sich die Frage nach einer Gefährdung durch den Verzehr infizierter Geflügelprodukte.

Welche Bedeutung Rohwurstprodukten bei der Übertragung humanpathogener Viren zukommt, kann derzeit nur anhand weniger objektiver wissenschaftlicher Fakten eingeschätzt werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich im folgendem mit Studien zu Tenazität und Inaktivierung von Viren in Rohwurstprodukten. Dabei wurde ECHO-Virus stellvertretend für die Spezies humaner Enteroviren untersucht. Enteroviren zeichnen sich durch eine hohe Tenazität aus. Als ein wichtiger Vertreter kann Polio-Virus angeführt werden, welches bekanntlich durch Lebensmittel übertragbar ist. Im Zuge der aktuellen Problematik mit aviären Influenzaviren wurden stellvertretend zwei niedrigpathogene Isolate aviärer Influenzaviren für die Versuchsreihen gewählt. Die gewonnenen Ergebnisse sollten dazu beitragen, die Rolle des Lebensmittels Rohwurst bei der Übertragung lebensmittelassoziierter Virusinfektionen besser abschätzen zu können (hinsichtlich einer Risikobewertung). Ebenso sollten Aussagen zu einer möglichen Risikominimierung vorgenommen werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Lebensmittelassoziierte Viren

#### 2.1.1 Begriff und Vertreter

Die Bedeutung von Viren als Krankheitserreger in Lebensmitteln ist im Laufe der vergangenen Jahre stark gestiegen. Infektiöse Gastroenteritiden werden dabei weit häufiger durch Viren verursacht als durch bakterielle Erreger. Die folgende Tabelle zeigt aktuelle Fallzahlen meldepflichtiger Darm- beziehungsweise Hepatitisserkrankungen für die Bundesrepublik Deutschland.

**Tabelle 1: Anzahl der vom Robert Koch-Institut erfassten meldepflichtigen Infektionserkrankungen für ausgewählte Erreger**

Jahr (1- 52. Woche)	<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>	Noroviren	Rotaviren	Hepatitis A-Virus	Hepatitis E-Virus
<b>2008</b>	64 534	42 789	211 247	77 336	939	101
<b>2007</b>	66 125	55 405	198 992	59 165	926	72
<b>2006</b>	52 044	52 600	75 838	67 027	1229	51

(modifiziert nach Robert Koch-Institut 2008, 2009)

In welchem Ausmaß Lebensmittel Bedeutung bei der Übertragung von Viren haben, ist bisher noch unzureichend untersucht. Anhand von Schätzungen kann man davon ausgehen, dass in den USA jährlich 76 Millionen Erkrankungen durch Lebensmittelverzehr hervorgerufen werden (MEAD *et al.* 1999). Von den 38 Millionen Lebensmittelerkrankungen infektiöser Natur wurden dabei circa 80 % durch Viren verursacht (MEAD *et al.* 1999).

Eine Studie aus den Niederlanden untersuchte Proben von 941 gemeldeten Ausbrüchen mit viraler Gastroenteritis für den Zeitraum von 1994 bis 2000 (SVARKA *et al.* 2007). Bei den untersuchten Stuhlproben (n=6707) dieser Langzeitüberwachung wurde in 78 % der Fälle Norovirus als verursachendes Pathogen ermittelt, in knapp 5 % der Fälle Rotavirus, in 1 % Adenovirus und in 0,5 % Astrovirus. Bei ca. 12 % der untersuchten Proben konnte der virale Erreger nicht ermittelt werden. Möglicherweise sind diese auf Noroviren, Birnaviren oder Enteroviren zurückzuführen. Bei 38 % der gemeldeten Ausbruchsfälle (n=359) war der Übertragungsweg bekannt. Es handelte sich überwiegend um eine Transmission von Mensch zu Mensch, in einigen Fällen konnten Lebensmittel als Infektionsquelle ermittelt werden. Bei 95 % der gemeldeten Ausbrüche war der Ort der Infektion bekannt: Im eigenen

Haushalt erfolgten die meisten Infektionen, gefolgt von Krankenhäusern, Restaurants, Tageszentren und Schulen.

Wie hoch der tatsächliche Anteil lebensmittelassoziierter Infektionen an der Gesamtzahl der viralen Gastroenteritiden ist, lässt sich nur annähernd abschätzen. Da keine Routineüberwachung von Lebensmitteln auf Viren existiert, sich der Nachweis im Lebensmittel häufig schwierig gestaltet und die meisten Erkrankungen im privaten Haushalt erfolgen, ist das Lebensmittel als Infektionsquelle schwer zu ermitteln. Für Infektionen mit Noroviren wurde der Anteil der lebensmittelbedingter Fälle für England und Wales auf 14 % (DEDMAN *et al.* 1998) und für die USA auf < 40 % (FRANKENHAUSER *et al.* 1998) geschätzt.

Für Deutschland wurden im Jahr 2006 1352 Fälle lebensmittelbedingter Krankheitsausbrüche an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) übermittelt. Davon konnten etwa 11 % ursächlich auf Viren zurückgeführt werden (Tabelle 2). Die meisten Ausbrüche traten dabei in Privathaushalten auf gefolgt von Restaurants und Hotels (BfR 2009).

**Tabelle 2: Von Deutschland an die EFSA gemeldete lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche für das Jahr 2006**

Infektionserreger	Gemeldete Ausbrüche	
	Anzahl	%
<i>Salmonella</i>	905	66,9
<i>Campylobacter</i>	207	15,3
Norovirus	140	10,4
Hepatitis A-Virus	15	1,1
<i>Yersinia</i>	13	1,0
<i>Giardia</i>	12	0,9
darmpathogene <i>E. coli</i>	7	0,5
<i>Shigella</i>	7	0,5
ECEC	6	0,4
<i>Cryptosporidium</i>	5	0,4
andere	≤1	≤0,1
gesamt	1352	

(modifiziert nach EFSA 2006)

Eine EU-weite Erfassung zum Anteil lebensmittelbedingter viraler Krankheitsausbrüche an der Gesamtzahl viraler Gastroenteritisfälle ist in Tabelle 3 für das Jahr 2000 dargestellt.

**Tabelle 3: Übersicht lebensmittelassoziierter viraler Gastroenteritisfälle in der EU**

<b>Lebensmittelassozierte virale Gastroenteritiden im Jahr 2000</b>		
	total	Lebensmittel-/ Wasserassoziiert (%)
Dänemark	17	94
England	290	7
Finnland	58	24
Frankreich	28	100
Deutschland	227	k.A.
Italien	2	0
Slowenien	14	14
Spanien	14	7
Schweden	190	k.A.
Niederlande	41	17

(modifiziert nach LOPMAN *et al.* (2003), Food borne Viruses in Europe group)

Lebensmittelassozierte Viren werden auch unter dem Begriff der sogenannten „food borne viruses“ zusammengefasst. Sie zeichnen sich im Allgemeinen durch folgende Charakteristika aus (KOOPMANS u. DUIZER 2004):

- niedrige infektiöse Dosis
- sehr umweltstabil und meist säureresistent
- hohe Zahl über Fäzes ausgeschiedener Viruspartikel
- leicht übertragbar, hoch kontagiös

Nach KOOPMANS *et al.* (2002) lassen sich die Viren in drei Kategorien aufteilen:

- Viren, die gastrointestinale Erkrankungen auslösen mit dem Zielorgan Magendarmtrakt,  
z. Bsp. Noroviren, Rotaviren, Adenoviren
- Viren, die über den enteralen Weg aufgenommen werden und Hepatitiden verursachen,  
z. Bsp. Hepatitis A-Virus, Hepatitis E-Virus
- Viren, die über den enteralen Weg in den Organismus gelangen, aber in anderen  
Zielorganen replizieren,  
z. Bsp. Enteroviren

**Tabelle 4: Übersicht zu Vertretern der „Food borne viruses“**

<b>Virus</b>	<b>Familie</b>	<b>Erkrankung</b>
Hepatitis A-Virus	<i>Picornaviridae</i>	Hepatitis
Hepatitis E-Virus	<i>Hepeviridae</i>	Hepatitis
Norovirus	<i>Caliciviridae</i>	Gastroenteritis zumeist mit heftigem Vomitus
Rotavirus	<i>Reoviridae</i>	Gastroenteritis, zumeist bei Kindern
Polio-Virus, Coxsackie-Virus, ECHO-Virus, Enterovirus	<i>Picornaviridae</i>	u.a. ZNS Infektionen, Gastroenteritis Kardiomyopathien
Aichivirus	<i>Picornaviridae</i>	Gastroenteritis
Astrovirus	<i>Astroviridae</i>	Gastroenteritis, zumeist bei Kindern
Adenovirus	<i>Adenoviridae</i>	Gastroenteritis
Saporovirus	<i>Caliciviridae</i>	Gastroenteritis

(modifiziert nach CARTER 2005)

Viren können sich im Gegensatz zu Bakterien nicht im Lebensmittel vermehren, da ihre Replikation an lebende Zellen gebunden ist. Somit stellt die Dosis an viralen Partikeln, welche in ein Lebensmittel gelangt, zugleich die maximale Ausgangsdosis für eine mögliche Infektion dar. Sind Viren einmal in das Produkt gelangt, so behalten sie ihre Infektiosität zumeist über Tage bis Wochen bei, besonders wenn die Lebensmittel unter Kühlung gelagert werden (KOOPMANS u. DUIZER 2004). Weiterhin führen Viren, in Abgrenzung zu vielen bakteriellen Erregern, zu keinerlei sensorischen Veränderungen der Lebensmittel.

Der Mensch infiziert sich auf fäkal-oralem beziehungsweise aerogen-oralem Weg, durch direkten Kontakt zu infizierten Personen oder über die Aufnahme der Erreger aus der Umwelt beziehungsweise über kontaminierte Lebensmittel oder Wasser.

### **2.1.2 Kontamination von Lebensmitteln und Nachweis der Viren**

Bei dem Eintrag der Viren in Lebensmittel kann zwischen der Form der primären Kontamination von Produkten und der Sekundärkontamination differenziert werden (CARTER 2005).

Bei der Primärkontamination gelangen die Viren bereits in oder auf das Rohprodukt, noch bevor dieses als Lebensmittel gewonnen wird. So können beispielsweise Muscheln in

abwasserbelasteten Meeresregionen zirkulierende Viren aufnehmen oder Pflanzen durch den Einsatz fäkal verunreinigten Wassers mit Viren kontaminiert werden.

Die Sekundärkontamination von Lebensmitteln kann durch den Eintrag der Viren an jeglicher Stelle der Lebensmittelkette bis zum Verzehr durch den Verbraucher erfolgen.

Indirekte Übertragungsformen aufgrund mangelnder Hygiene bei der Zubereitung beziehungsweise im Umgang mit Lebensmitteln spielen eine entscheidende Rolle. Infizierte Personen scheiden in der Regel Viren in großer Zahl mit dem Stuhl aus und in Form von Aerosolen (beispielsweise beim Erbrechen). Im Umgang mit Lebensmitteln können sie diese daher mit einer hohen Virusanzahl kontaminieren. Ebenso können die Verwendung von kontaminiertem, fäkal verunreinigtem Wasser bei der Speisenzubereitung oder das Zubereiten auf kontaminierten Oberflächen sowie der Einsatz virusbelasteter (Küchen-) Gegenstände als wichtige Eintragsquellen genannt werden (KOOPMANS u. DUIZER 2004). Auch eine ungeschützte Lagerung von fertigen Speisen ermöglicht den nachträglichen Eintrag viraler Erreger aus der Umwelt.

Prinzipiell stellen Lebensmittel, die einer intensiven manuellen Verarbeitung unterliegen, unter Bedingungen schlechter Hygiene zubereitet oder nach der Gewinnung zum unmittelbaren Verzehr bestimmt sind, potentielle Risikoprodukte dar, insofern sie keiner anschließenden Erhitzung unterliegen.

Die Liste an Lebensmitteln, die in Zusammenhang mit Virusinfektionen ermittelt wurden, gestaltet sich vielfältig. Häufig betroffen waren:

- Salate, Obst, Gemüse
- Wasser, Eiswürfel
- Muscheln
- Sandwiches, Wurstaufschnitte, Backwaren
- Säfte
- u.a.

Der aktuelle Trend zum Verzehr von so genannten „minimal processed foods“ und möglichst natur belassener, frischer Lebensmittel sowie die zunehmende Gewohnheit, Lebensmittel außer Haus fertig zubereitet zu verzehren, tragen zu ansteigenden Erkrankungszahlen mit lebensmittelassoziierten Mikroorganismen bei (WHO 2008).

Der Nachweis der Viren in Lebensmitteln gestaltet sich vor allem aus folgenden Gründen schwierig (CARTER 2005, KOOPMANS *et al.* 2002):

- Fehlen sensorischer Veränderungen im Lebensmittel
- nur sehr geringe Anzahl an Viruspartikeln im Lebensmittel
- breites Spektrum an Viren und Lebensmittelmatrixen
- Fehlen einheitlicher Isolierungsmethoden
- unzureichende oder keine Kultivierbarkeit vieler Viren
- teilweise hohe genetische Variabilitäten unter den Virusstämmen, Fehlen einheitlicher Detektionssysteme für PCR

So gibt es mit der Ausnahme von Muscheln kaum eine Routineüberwachung bei Lebensmitteln hinsichtlich des Vorkommens von Viren.

Im Zusammenhang mit lebensmittelassoziierten Viruserkrankungen sind als häufigste Vertreter Noroviren und Hepatitis A-Viren zu nennen (CLIVER 1997).

### **2.1.3 Zoonotisches Potential**

Der Begriff der „Zoonose“ beschreibt Infektionskrankheiten, welche vom Tier auf den Mensch und vom Mensch auf das Tier übertragbar sind. Im Zusammenhang mit lebensmittelassoziierten Viren ergibt sich die Frage einer Übertragbarkeit dieser Viren von Tier zu Mensch – zum einen auf dem Weg direkten Kontaktes, zum anderen über den Kontakt beziehungsweise den Verzehr infizierter tierischer Produkte.

Die Übertragung von Hepatitis E-Viren geschieht auf fäkal-oralem Infektionsweg, zumeist über kontaminiertes Trinkwasser, in einigen Fällen auch über kontaminierte Lebensmittel. Berichte über Infektionen von Menschen nach Verzehr von ungenügend erhitztem Fleisch von Wildtieren, lassen ein zoonotisches Potential dieser Erkrankung vermuten (JOHNE *et al.* 2008). So wurden bei Schweinen Hepatitis E-Viren gefunden, die in nahezu identischer Form auch beim Menschen entdeckt werden konnten (MENG *et al.* 1997). Eine erste Studie zur Hepatitis E-Verbreitung zeigt, dass auch in Deutschland ein hoher Prozentsatz an Wildschweinen mit Hepatitis E-Virus infiziert ist (KACI *et al.* 2008).

Die Möglichkeit einer Übertragung der Erkrankung TBE (Tick-borne encephalitis) durch den Konsum ungenügend erhitzter Milch oder Milchprodukte ist bereits in mehreren Fällen beschrieben (JEZYNA *et al.* 1984, HERZIG *et al.* 2002). Der Erreger aus der Familie der *Flaviviridae* kann in der Milch von virusinfizierten Ziegen und Schafen auftreten, seltener in der Milch von Kühen.



Die aviäre Influenza wurde lange Zeit als unbedenklich für den Menschen eingestuft, bis im Jahr 1997 erstmals Menschen an einem originär aviären Influenzavirus Typ H5N1 schwer erkrankten, zum Teil mit Todesfolge (WHO 2008). Die Infektion wird über engen Kontakt zu infiziertem Geflügel oder über den Umgang mit infizierten Geflügelprodukten übertragen, als auch durch deren Verzehr.

Rotaviren treten sowohl beim Menschen als auch bei zahlreichen Haus- und Nutztieren auf. Animale Rotaviren sind als potentiell Reservoir für den genetischen Austausch mit humanen Rotavirusstämmen in Betracht zu ziehen. Es gibt vermehrt Grund zur Annahme, dass animale Rotaviren auch Menschen infizieren können, sei es durch direkte Virusübertragung oder auf dem Weg der Entstehung von Reassortanten bei Ko-Infektionen (MÜLLER u. JOHNE 2007). Typenkombinationen, wie sie normalerweise beim Menschen auftreten, wurden auch bei Tieren gefunden, u. a. bei Rindern (LUCHELLI *et al.* 1994, GULATI *et al.* 1999) und bei Schweinen (SANTOS *et al.* 1999, WINIARCZYK *et al.* 2002). Von Menschen konnten dagegen Stämme isoliert werden, die sonst bei Tieren gefunden werden (DESSELSBERGER *et al.* 2001). Für einzelne Fälle wurde die direkte Erkrankung von Personen mit einem animalen Rotavirusstamm berichtet (NAKAGOMI u. NAKAGOMI 1989). So erkrankte beispielsweise ein Kind an einem feline Rotavirus, ein anderes Kind an einem kaninen Virusstamm (NAKAGOMI *et al.* 1992).

Die in Zusammenhang mit infektiösen viralen Gastroenteritiden am häufigsten beobachteten Noroviren treten ebenfalls bei Mensch und Tier auf. So ist das Vorkommen von Norovirusstämmen bei Schwein, Rind und Maus bekannt. Porzine Noroviren, die bei Schweinen in Japan, den Niederlanden und den USA gefunden wurden (VAN DER POEL *et al.* 2000, WANG *et al.* 2005, SUIGEDA *et al.* 1998), wiesen genetisch große Ähnlichkeit zu den humanen Noroviren auf. Die bei Rindern entdeckten Noroviren zeigten dagegen wenig Ähnlichkeit zu den humanen Stämmen (OLIVER *et al.* 2003). Das Entstehen möglicher Norovirusrekombinanten aus humanen und animalen Virusstämmen bei Ko-Infektion eines Wirtes mit zwei genetisch ähnlichen Viren wird diskutiert. In einer Studie wurden bei der Untersuchung von Kotproben von Rind und Schwein sowohl porcine als auch bovine Norovirusisolate entdeckt, die Gensequenzen humaner Noroviren aufwiesen (MATTISON *et al.* 2007).

Somit ist eine zoonotische Übertragung von Erregern auf dem Weg infizierter tierischer Produkte im Zusammenhang mit lebensmittelassoziierten Viren durchaus von Bedeutung.

## 2.2 Humane Enteroviren - ECHO-Virus

### 2.2.1 Taxonomie

Das Genus Enterovirus gehört zur Familie der *Picornaviridae*. Das Genus umfasst derzeit die humanen Enteroviruspezies (HEV): Humanes Enterovirus A, B, C, D und Polio-Virus (STANWAY *et al.* 2005, International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) und darüber hinaus bovine und porcine Enteroviruspezies.

Weit über 80 Serotypen sind derzeit bei Enteroviren bekannt (PALLANSCH u. ROOS 2001), darunter auch einige Serotypen, die vorläufig dem Genus Enterovirus zugeordnet wurden, aber noch keiner Spezies zugeteilt sind (ICTV 2002).

**Tabelle 5: Übersicht zu Serotypen humaner Enteroviren**

Virus	Serotypen
Polio-Virus	1, 2, 3
Coxsackie-Virus A	1 - 24
Coxsackie-Virus B	1 - 6
ECHO-Virus	1 – 7, 9, 11 – 27, 29 - 33
Enterovirus	68, 79, 71

(modifiziert nach ICTV data base, 2002)

Die Spezies Humanes Enterovirus B umfasst zur Zeit alle Serotypen von ECHO-Viren (enteric, cytopathogenic, human, orphan virus), verschiedener Coxsackie-Viren sowie einem Enterovirustyp.

### 2.2.2 Virusaufbau

Enteroviren sind unbehüllte Viren mit einem ikosaedrisch aufgebauten Kapsid von 24 bis 30 nm Durchmesser. Das Kapsid setzt sich aus 60 Untereinheiten, den Kapsomeren, zusammen, welche jeweils durch die Strukturproteine VP1 bis VP4 gebildet werden. VP4 ist dabei nur an der Innenseite des Kapsids lokalisiert und mit dem RNA-Genom verbunden. VP1 bis VP3 bilden die Außenflächen der Ikosaeder. Die Sequenz der Proteine VP1 bis VP3 im Kapsid entscheidet dabei über den jeweiligen Serotyp der Enteroviren. Häufig sind im Bereich der Ikosaederecken grabenähnliche Vertiefungen der Oberflächenstruktur, so genannte Canyons zu finden. Die Canyonregionen, die aus Interaktionen verschiedener Aminosäurereste der Strukturproteine VP1, VP2 und VP3 hervorgehen, dienen den Viren zur Adsorption an zelluläre Rezeptoren (MODROW *et al.* 2003). Das Virusgenom in Form einer Einzelstrang-RNA in Plusstrangorientierung umfasst ca. 7400 Basenpaare. Der RNA-Strang

ist aus drei Abschnitten aufgebaut: der 5`NTR- Region, der kodierenden Region und der 3`NTR-Region mit Poly A-tail. Das 5`Ende besitzt keine Cap Struktur. Die Basenabschnitte an diesem Ende besitzen dafür eine ausgeprägte Sekundärstruktur mit Aktivität einer IRES (internal ribosomal entry site). Weiterhin befindet sich am 5`Ende in kovalenter Bindung ein kleines, 22 Aminosäuren umfassendes Protein, das VPg-Protein. Dieses wird mit Beginn der Translation abgespalten. Das Virusgenom enthält einen großen offenen Leserahmen, der für ein Vorläuferprotein kodiert. Dieses Polyprotein umfasst drei Bereiche, die bei der Proteinspaltung entstehen: Einen aminoterminalen Bereich mit Vorläufersequenzen viraler Kapsidproteine, einen mittigen Bereich mit Nichtstrukturproteinen und einen carboxyterminalen Bereich mit viralen Enzyme und Nichtstrukturproteinen.

Das Polyprotein wird von viralen Proteinasen prozessiert. Es entstehen daraus final elf virale Proteine.

**Tabelle 6: Funktion verschiedener Proteine von Enteroviren**

Protein	Funktion
1 A - 1 D-Proteine (VP 1, 2, 3, 4)	Kapsidproteine VP 1-3 bilden Kapsidaußenfläche VP 4 nur an Kapsidinnenfläche
2 A-Protease	Kotranslationale Abspaltung des Protomers vom Polyprotein, proteolytische Spaltungen
2 B-Protein	Beteiligung an Genomreplikation und Wirtsspezifität
2 C-Protein	Initiation der RNA-Synthese
3 A-Protein	Uridinylierung von 3 B
3 B-Protein (VPg)	Wirkung als Primer bei RNA-Polymerisation
3C-Protease	Prozessierung von Kapsidproteinen Spezifischer Abbau zellulärer Komponenten
3 D-Polymerase	RNA-abhängige RNA-Polymerase Synthetisierung von RNA-Strang mit Negativorientierung als Matritze für neue Positivstranggenome

### 2.2.3 Pathogenese

Eine Infektion mit Enteroviren kann je nach Spezies über den Weg der enteralen Aufnahme oder durch die Aufnahme von Viren über den oberen Respirationstrakt erfolgen. Bei oraler Aufnahme passieren die Viren aufgrund ihrer Säurestabilität den Magen und infizieren zunächst Epithelzellen des Enterums. Eine erste Virusvermehrung findet in den regionalen lymphatischen Geweben des Darmes statt. Über das Blut oder infizierte Lymphozyten

gelangen die Erreger in der Virämiephase anschließend in die jeweiligen Zielgewebe (Myokard, Zentralnervensystem, Muskulatur, Haut etc.). Die Ausscheidung der Viren erfolgt über den Stuhl. Es konnten Mengen von  $10^5$  bis  $10^{11}$  Viruspartikel pro Gramm Stuhl über einen Zeitraum von bis zu 16 Wochen nachgewiesen werden (FONG u. LIPP 2005, GREGORY *et al.* 2006). Eine Persistenz der Viren im Darmtrakt ist bis zu mehreren Wochen möglich (TAKAO *et al.* 2000).

Die Aufnahme der Enteroviren über den Respirationstrakt geschieht in Form von Tröpfcheninfektion. Hier erfolgt zunächst eine Virusinfektion der Nasen- bzw. Rachenschleimhäute. Die Virusinfektion kann lokalisiert im Bereich dieser Schleimhäute verlaufen oder sich über angrenzende Lymphknoten auf hämatogenem Weg auf weitere Zielgewebe ausdehnen.

Enteroviren besitzen unterschiedliche Gewebetropismen (FONG u. LIPP 2005). So ist der Neurotropismus der einzelnen Enterovirus-Serotypen unterschiedlich ausgeprägt: Während alle drei Serotypen des Polio-Virus einen ausgeprägten Neurotropismus besitzen, sind bei ECHO-Viren die Typen 30, 7, 9, 11, das Coxsackievirus B 5 und die Enterovirustypen 70, 71 für ihre Neurovirulenz bekannt (ROTBART 1995).

#### **2.2.4 Wirtsspektrum**

Eine Vielzahl von Enterovirus-Serotypen ist an den Menschen adaptiert (PALLANSCH u. ROOS, 2001). Daneben gibt es einige Serotypen die bei Schwein, Rind sowie Primaten auftreten. Beim Schwein ruft das Porzine Enterovirus 1 die „Teschen Krankheit“ und das Swine vesicular disease-Virus die Vesikulärkrankheit des Schweins hervor. Der einzige natürliche Wirt für ECHO-, Polio- und Coxsackie-Viren scheint der Mensch zu sein.

#### **2.2.5 Epidemiologie und Klinik**

Infektionen mit Enteroviren treten weltweit auf. Sie verursachen neben endemischen Virusinfektionen auch epidemische Ausbrüche. In gemäßigten Breiten zeigen sich saisonale Häufungen in den Sommermonaten bis zum Frühherbst. In wärmeren Regionen treten Infektionen ganzjährig in Erscheinung. Enteroviren können ein breites Spektrum an Erkrankungen verursachen, sie verlaufen jedoch in 90 bis 95 % der Fälle asymptomatisch (RKI 2008). Bei klinischer Manifestation überwiegt die Verlaufsform eines unspezifischen fieberhaften Infektes (DAGAN 1996, KRETH 1997, MC CARTHY *et al.* 2000). Die durchschnittliche Inkubationszeit bei Enteroviruserkrankungen beträgt drei bis zehn Tage. Nach den Rhinoviren zählen Enteroviren zu den häufigsten viralen Erregern, die allgemeine

Erkältungserkrankungen beim Menschen hervorrufen. Weitere durch Enteroviren verursachte Krankheitsbilder sind in der nachfolgenden Übersicht (Tabelle 7) dargestellt.

**Tabelle 7: Übersicht zu Erkrankungen hervorgerufen durch humane Enteroviren**

<b>Virus</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Erkrankung</b>
Polio-Virus	1-3	grippeähnliche Symptome, aseptische Meningitis, Paralysen
Coxsackie A-Virus	1, 2, 7, 9, 10, 14, 16, 22 9, 10, 16, 21, 24 2-6, 8, 10, 22	aseptische Meningitis respiratorische Erkrankungen Herpangina
Coxsackie B-Virus	1- 5 1- 6	Perikarditis, Myokarditis, Meningoenzephalitis aseptische Meningitis
ECHO-Virus	1-9, 11, 13- 21, 24-27, 29- 33 1, 6, 9, 19, 21 1, 6, 9 4, 9, 11, 20, 21, 25 4, 9, 11, 20, 21, 25	aseptische Meningitis Perikarditis, Myokarditis Myalgien respiratorische Erkrankungen Gastroenteritis (Kleinkinder)
Enterovirus	68, 96 70 71	Pneumonie akute hämorrhagische Konjunktivitis Meningitis, Hand-Fuß-Mund Krankheit

In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich um selbst limitierende Infektionen, fatale Verläufe sind selten (DIEDRICH u. SCHREIER 2001). Kinder sind von Erkrankungen mit Enteroviren häufiger betroffen als Erwachsene.

Die Bedeutung von Enteroviren als Erreger von ZNS-Infektionen wird zunehmend erkannt. Als Verursacher von aseptischen Meningitiden gelten Non-Polio-Enteroviren als die häufigsten viralen Erreger weltweit (SAWYER 2002, CONNOLLY u. HAMMER 1990). Dabei treten ECHO-Viren am häufigsten in Erscheinung (DIEDRICH u. SCHREIER 2001). In Deutschland ist vor allem der Serotyp ECHO 30 häufig mit Meningitiden assoziiert (Tabelle 8). Die aseptische Meningitis tritt dabei bei Kindern häufiger auf als bei Erwachsenen (NICOLOSI *et al.* 1986). Sie ist bei Kindern die am häufigsten beobachtete ernsthafte Erkrankung in Zusammenhang mit HEV (DIEDRICH u. SCHREIER 2001, LEE *et al.* 2007).

Enterovirusinfektionen sind nach deutschem Infektionsschutzgesetz nicht meldepflichtig. Das Auftreten von Infektionen wird aber seit einigen Jahren in Deutschland auf nationaler Ebene im Rahmen eines Enterovirus Surveillance–Programms erfasst. In der folgenden Übersicht ist die Enterovirusdiagnostik für den Zeitraum von 2005 bis 2009 dargestellt. Dabei erfolgte eine Typisierung von 1747 Patientenproben (=100 %). 40 Proben waren keinem Enterovirus zuzuordnen. Bei 875 Proben (50 %) wurde ECHO-Virus Serotyp 30 als Erreger diagnostiziert (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Ergebnisse der Enterovirus-Surveillance in Deutschland, (Stand vom 29.01.2009)**

	2005	2006	2007	2008	Jan 2009
<u>Untersuchte Erreger:</u>	Anzahl der Infektionen insgesamt				
Coxsackie-Virus, ECHO-Virus, Enterovirus, Non-Polio-Enteroviruses	61	410	397	897	0

### 2.2.6 Tenazität und Vorkommen in Lebensmitteln

Enteroviren zeichnen sich durch eine hohe Tenazität und Stabilität aus. Sie tolerieren pH-Werte bis zu pH 3, was ihnen den Infektionsweg über die Passage des Magens in den Darmtrakt ermöglicht. Die hohe Säureresistenz scheint mit der genetische Stabilität der Viren verbunden zu sein, da nur wenige AS-Sequenzen eine derartig hohe Stabilität verleihen (MODROW *et al.* 2003). Mit der Fähigkeit, über lange Zeiträume außerhalb eines Wirtsorganismus zu überdauern, bergen HEV ein gewisses Infektionsrisiko für den Menschen, wenn sie in Gewässern, im Boden oder auf Lebensmitteln auftreten. NPEV wurden unter anderem in Wasser, im Boden, bei Gemüse und Muscheln gefunden und können über kontaminierte Nahrungsmittel übertragen werden (WHO 2008).

In Abwässern sind humane Enteroviren die am häufigsten nachgewiesenen Viren. (RUSIN *et al.* 2000). Bei Untersuchungen von Muscheln auf das Vorkommen von Viren, konnte unter den viralen Erregern am häufigsten humane Enteroviren nachgewiesen werden (GERBA u. GOYAL 1978).

Bedingt durch ihr häufiges Vorkommen in Abwässern, werden die Enteroviren in großer Zahl in Muscheln angereichert, welche in küstennahen, abwasserbelasteten Regionen leben.

Bei einer Untersuchung auf Enteroviren in Rinderhackfleisch aus dem Handel, konnte aus drei von insgesamt zwölf untersuchten Proben Polio-Virus und ECHO-Virus isoliert werden (SULLIVAN *et al.* 1970).

Unter Kühlbedingungen können Enteroviren ihre Infektiosität länger bewahren als bei höheren Temperaturen, vergleichsweise bei Raumtemperatur. Dies ergaben sowohl Untersuchungen in Wasser, in Bodenproben als auch in beziehungsweise auf Lebensmitteln (Tabelle 9). Es wurde weiterhin ein Einfluss der Feuchtigkeit beobachtet. Nach Austrocknung des Virusinokulums auf Oberflächen von Gemüse konnte nach wenigen Tagen kein

infektionsfähiges Virus mehr detektiert werden. Der Zusatz von Faeces zum Inokulum verzögerte die Titerreduktion (KONOWALCHUK u. SPEIRS 1975).

Nach Lufttrocknung von Bodenproben konnten nach 25 Tagen keine Viren mehr nachgewiesen werden im Gegensatz zu den nicht-getrockneten Kontroll-Proben. Kein entscheidender Effekt wurde bei Inkubation von sterilisierten und nicht-sterilisierten Bodenproben mit den Viren beobachtet (BAGDASARYAN 1964).

**Tabelle 9: Übersicht zu Tenazitätsstudien mit humanen Enteroviren**

<b>Virus</b>	<b>Matrix/ Versuchsbedingungen</b>	<b>Tenazität</b>	<b>Autor</b>
Coxsackie-Virus B3 ECHO-Virus 7 Polio-Virus 1	Oberflächenwasser  Viren in 5 verschiedenen Gewässerproben inkubiert  bei Temperaturen von: 20 °C, 1 °C und -20 °C	Titerreduktion:  bei 20 °C binnen 8 Wochen um $\approx 6,5-7 \log_{10}$ Stufen  bei 1 °C binnen 12 Wochen um $\approx 4-5 \log_{10}$ Stufen  bei -20 °C binnen 12 Wochen $< 1 \log_{10}$ Stufe	HURST et al., 1989
Polio-Virus 1 Echovirus 7, 9 Coxsackie-Virus B3	Bodenproben Sandboden, Lehm Boden  Viren in verschiedenen Bodenproben $\approx 10g$ bei verschiedenen Bedingungen inkubiert (pH/ Temperatur)	Tenazität:  bei pH 7,5: 110 -170 d  bei pH 5,0: 25 – 60 d  bei 3-10 °C: 110- 130 d  bei 23-28 °C: 40 – 90 d	BAGDASARYAN, 1964
Polio-Virus Echo-Virus Coxsackie-Virus B3	Stabilität der Viren auf Oberflächen verschiedener Gemüse:  Salat, Tomate, Gurke, Rettich  Gemüseoberflächen mit Virussuspension kontaminiert, Lagerung: bei 4 °C/ Raumtemperatur über 10 – 15 Tage	Erhalt der Infektiosität  bei 4 °C mit Titerverlust $< 1 \log_{10}$ Stufe  bei Raumtemperatur mit Titerverlust von $2-2,5 \log_{10}$ Stufen	BAGDASARYAN, 1964
Coxsackie-Virus	Stabilität der Viren auf Oberflächen von Früchten:  Erdbeeren, Kirschen, Pfirsiche  Fruchtoberflächen mit Virussuspension kontaminiert, Lagerung: bei 4 °C über 6 Tage in verschlossenen oder offenen Behältnissen	Wiederfindung:  in geschloss. Behältnis: bis zu 100% auf Kirschen  in offenem Behältnis: unter 1%  höhere Tenazität beobachtet, wenn Virussuspension zusätzlich mit Faeces versetzt, Schutz vor Austrocknung	KONOWALCHUK u. SPEIRS, 1975

Fortsetzung Tabelle 9

Coxsackie-Virus B5 Polio-Virus 1 ECHO-Virus 7 Reovirus Adenovirus	Stabilität der Viren auf Gemüseoberflächen:  Sellerie, Salat, Karotte, Paprika, Tomate, Rettich  Viren in wässriger Suspension oder in Faecessuspension auf Gemüseoberfläche Lagerung: bei 4 °C über 8 Tage in verschlossenen oder offenen Behältnissen	Wiederfindung:  in geschloss. Behältnissen: keine Virusreduktion  in offenen Behältnissen: Eintrocknen des Inokulums, kein infektiöses Virus nach 4 d  Virussuspension mit Faeces versetzt – verzögerte Titerreduktion	KONOWALCHUK u. SPEIRS, 1975
Polio-Virus Coxsackie-Virus ECHO-Virus	Tenazität der Viren in Milchprodukten  in pasteurisierter und gekochter Milch, bei 4 °C und 25 °C (Polio und Coxsackie)  in Joghurt bei 4 °C (Polio, Coxsackie, ECHO)	Tenazität: in Milch bei 4 °C: für mind. 90 d  in Milch bei 25 °C für 15 bzw. 30 d  in Joghurt bei 4 °C: 90 d für Polio/Coxsackie-Virus, 120 d für ECHO-Virus	TIRON, 1992
Polio-Virus 1, 2 ECHO-Virus	Tenazität der Viren in „low moisture foods“, gefriergetrocknet  Lebensmittel mit Viren kontaminiert, Abpackung unter Vakuum, Lagerung	Tenazität:  bei 5 – 12 °C bis zu 2 Monaten	CLIVER et al., 1970
Coxsackie-Virus 9	Tenazität der Viren in rohem Rinderhackfleisch  Fleisch artifiziell kontaminiert mit Viren	Titerreduktion:  bei 4 °C um 2-3 log <sub>10</sub> Stufen in 14 d	HERRMANN u. CLIVER, 1973
ECHO-Virus Coxsackie-Virus	Tenazität der Viren in Rohwurst (Salami, Zervelatwurst)	Titerreduktion:  in Salami keine deutliche Reduktion über 43 / 56 d  in Zervelatwurst durch Erhitzungsprozess Reduktion, danach hohe Virusstabilität über 1 Woche bei 4 °C	KANTOR u. POTTER, 1975

### 2.2.7 Infektionsgefahr durch Enteroviren in Lebensmitteln

Aufgrund ihres häufigen Vorkommens in der Umwelt und ihrer hohen Tenazität erscheint ein Eintrag von Enteroviren in Lebensmittel auf dem Weg primärer oder sekundärer Kontamination mit anschließender Viruspersistenz im Lebensmittel als möglich. Bei Ausbrüchen mit sporadischen als auch epidemischen Enterovirusinfektionen bleibt die



Infektionsquelle zumeist unbekannt. Die Rolle von Lebensmitteln ist im epidemiologischen Zusammenhang mit Enterovirusinfektionen kaum erforscht.

## 2.3 Aviäre Influenzaviren

### 2.3.1 Taxonomie und Nomenklatur

Influenzaviren gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Dieser Familie sind die drei Genera Influenza A, B und C zugeordnet. Während Influenza A-Viren ein sehr breites Wirtsspektrum aufweisen, beschränken sich Influenza B- und C-Stämme vorrangig auf den Menschen oder das Schwein.

**Tabelle 10: Übersicht zu Influenzavirus-Subtypen und ihren Wirtsspezies**

Genus	Wirtsspezies	Subtypen (A) / Linien (B)
Influenza A	Mensch Vogel Pferd Robbe Schwein Wal Nerz u.a.	H1N1, H1N2, H3N2 H1-16 N1-9 H3N8, H7N7 H7N7, H3N3, H4N6 H1N1, H1N2, H3N2 H1N3, H13N2, H13N9 H10N4
Influenza B	Mensch, Robbe	B/ Victoria Linie und B/ Yamagata Linie
Influenza C	Mensch, Schwein	-

(HAY *et al.* 2001, HORIMOTO u. KAWAOKA 2001, WEBSTER *et al.* 1992)

Die Genuszugehörigkeit der Influenzaviren wird durch die Unterschiede in den Matrixproteinen (M) und Nukleoproteinen (NP) bestimmt.

Die Nomenklatur für einzelne Influenzavirusisolate ist von der WHO vereinheitlicht vorgegeben. Es wird der Typ, der Ort der Isolierung, die Nummer des Isolats und das Jahr der Isolierung. Bei Influenza A-Viren wird der Subtyp in Klammern hinzugefügt.

### 2.3.2 Aufbau von Influenza A-Viren

Bei Influenzaviren handelt es sich um pleomorphe Viruspartikel mit einem Durchmesser von 80 bis 120 nm. Die Viren sind behüllt. Die doppelschichtige Lipidhülle leitet sich von der Zellmembran infizierten Wirtszellen ab und wird durch „budding“ neuer Viruspartikel an der Zellmembran erworben.

In der Virushülle eingelagert befinden sich bei Influenza A- und B-Viren die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Influenza C-Viren besitzen nur ein Glykoprotein, das Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein (HERRLER u. KLENK 1991).

Die Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase sind die zwei wichtigsten stammspezifischen Oberflächenproteine. Sie stellen sogleich die bedeutendsten antigenen Determinanten für eine gerichtete Immunantwort seitens des Wirtsorganismus dar. Die Bildung neutralisierender Antikörper erfolgt nur gegen HA, nicht jedoch gegen NA (SUAREZ u. SCHULTZ-CHERRY 2000). Das HA vermittelt die Virusadsorption an zelluläre Rezeptoren, die endständig N-Acetyl-Neuraminsäuren besitzen. Weiterhin besitzt das Hämagglutinin die Fähigkeit, N-Acetylneuraminsäurehaltige Proteine auf der Oberfläche von aviären Erythrozyten und denen einiger Säugetiere zu binden und somit die Erythrozyten zu aggregieren.

Das Protein Neuraminidase reguliert im Anschluss an die Virusreplikation die Abspaltung endständiger Neuraminsäuren vom Viruspartikel und von zellulären Glykoproteinen und erleichtert so das Ausschleusen der Viruspartikel aus der Zelle und die Weiterverbreitung zu neuen Zellen (AMINOFF 1961, VAN DEUSEN *et al.* 1983, PALMER *et al.* 1975).

Anhand der Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase lassen sich Influenza A-Viren serologisch in Subtypen unterteilen. Es sind zur Zeit 16 Hämagglutinin- und neun Neuraminidase-Typen bekannt, welche frei miteinander kombinierbar auftreten (FOUCHIER *et al.* 2005). Darüber hinaus ist in der Hülle in geringen Mengen das Matrixprotein M2 eingelagert. Unter der Virushülle befindet sich eine Schicht aus Matrix-Proteinen M1, welche den Viruskern mit dem darin befindlichen Virusgenom umgeben. Das Virusgenom umfasst insgesamt circa 14 000 Nukleotide, welche sich auf acht einzelsträngige RNA-Segmente mit Negativstrangorientierung aufteilen.

Diese RNA-Segmente kodieren für insgesamt zehn virale Proteine (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Funktion verschiedener Proteine von Influenza A-Viren**

Protein	Funktion
Hämagglutinin	Virusadsorption an zelluläre Rezeptoren
Neuraminidase	Abspaltung terminaler Neuraminsäuren
Matrixproteine M1 und M2	M1genusspezifisch, RNP Transport
	M2 Funktion als Ionenkanal
Nukleokapsidprotein	genusspezifisch, Transport von RNP's in Zellkern
Polymeraseproteine P1, P2 und PA	Polymerisierung der Virus RNA
Nichtstrukturproteine N1 und N2	N1 nicht im Virion, beteiligt an Virusreplikation
	N2 Export von RNP's aus Zellkern

Die Segmentierung des Genoms ermöglicht eine hohe genetische Variabilität auf Basis des Reassortments (antigenetic shift). Ist eine Zelle gleichzeitig mit zwei verschiedenen Influenzaviren infiziert, können durch Austausch von Gensegmenten neue genetische Varianten entstehen. Daneben existiert wie bei allen Viren die Möglichkeit der Punktmutation in einzelnen Nukleotiden (antigenetic drift) (MURPHY u. WEBSTER 1996).

### **2.3.3 Pathogenese**

Das HA ist der primär bestimmende Faktor der Pathogenität. Die Aminosäuresequenz für die proteolytische Spaltstelle des HA entscheidet, ob eine Infektion mit dem Virus systemisch oder lokal begrenzt verläuft, je nachdem welche Art von Proteasen diese Spaltstelle erkennt und spaltet (ROTT 1992).

Die proteolytische Spaltung des HA-Vorläufermoleküls HA0 stellt die Grundvoraussetzung für die Infektionsfähigkeit der Viren dar (KLENK *et al.* 1975, LAZAROWITZ u. CHOPPIN 1975, GARTEN u. KLENK 1999). Diese erfolgt post-translational durch zelluläre Proteasen, wobei die zwei Untereinheiten HA1 und HA2 entstehen.

Kann die HA-Spaltstelle ausschließlich von extrazellulären Wirtsproteasen, welche in den Epithelien des Respirations- oder Gastrointestinaltraktes vorkommen, erkannt und gespalten werden, so begrenzt sich die Virusinfektion lokal auf diese Gewebe (HORIMOTO *et al.* 1994) (2.3.5).

Erfolgt die Spaltung des HA durch intrazelluläre ubiquitäre Endoproteasen, Enzyme die in sämtlichen Zellen vorkommen, so folgt daraus die Infektion verschiedenster Gewebe mit resultierender systemischer Infektion des Wirtsorganismus. (VEY *et al.* 1992, WOOD *et al.* 1993, SENNE *et al.* 1996) (siehe 2.3.5).

### **2.3.4 Wirtsspektrum**

Die Wirtsspezifität der Influenzaviren wird unter anderem über die Rezeptoraffinität des HA vermittelt. Es existieren verschiedene Bindungstypen der endständigen N-Acetyl-Neuraminsäuren an Galaktose (CONNOR *et al.* 1994, SKEHEL u. WILEY 2000). Mutationen im HA-Protein, die zu veränderter Bindungspräferenz des HA führen, spielen somit eine entscheidende Rolle bei Adaptation an neue Wirte (ROGERS *et al.* 1983, VINES *et al.* 1998, MATROSOVICH *et al.* 2000). So konnten einzelne Influenzasubtypen die Speziesbarriere überwinden, nachdem Mutationen auftraten, die zu einer Veränderung der Bindungsaffinität des HA führten (NAEVE *et al.* 1984, CONNOR *et al.* 1994, MATROSOVICH *et al.* 2000, GLASER *et al.* 2005).

Für die Konversion eines niedrigpathogenen aviären Influenzavirus (LPAI) zu einem hochpathogenen Influenzavirus (HPAI) spielt ebenfalls die Veränderung der Spaltbarkeit des HA eine wichtige Rolle. Insgesamt kann ein nur geringes Ausmaß an Mutationen bereits die Konversion auslösen.

### **2.3.5 Klinische Erscheinungen bei Vogel und Mensch**

Hinsichtlich ihrer klinischen Ausprägungen werden Influenza-Viren bei Vögeln in HPAI oder LPAI klassifiziert. Diese Klassifizierung erfolgt nach den Vorgaben der OIE basierend auf *in-vivo*-Tests der Viren.

LPAI verursachen milde Krankheitsbilder bis asymptomatische Verläufe beim Vogel. Es handelt sich hierbei um lokale Infektionen des Respirationstraktes und/oder des Intestinaltraktes. Die Virusausscheidung erfolgt hauptsächlich über den Kot, aber auch über Kopfsekrete. Dabei gelangen die Influenzaviren in großer Zahl ins Wasser, welches eine wichtige Rolle bei der Übertragung von Infektionen spielt. Vögel infizieren sich auf dem oro-nasalen Weg durch Aufnahme beziehungsweise Kontakt mit viruskontaminiertem Wasser, Kot, Futter oder infizierten Artgenossen.

HPAI verursachen dagegen akute bis perakute Krankheitsverläufe mit hohen Mortalitätsraten von bis zu 100 % binnen 48 Stunden (OIE 2008). Als klinische Symptome können bei akuter Infektion respiratorische und gastrointestinale Symptome, Apathie, Inappetenz, Ödembildung, Zyanosen, Hautveränderungen, zentralnervöse Symptome, rapider Abfall der Legeleistung und verminderte Eizualitäten auftreten.

Die beim Menschen zumeist saisonal auftretenden Influenzainfektionen können sowohl als asymptomatische als auch schwer fieberhafte Erkrankungen verlaufen. Die Infektion erfolgt durch die Virusaufnahme über den oberen Respirationstrakt in Form von Tröpfcheninfektion oder virushaltigen Aerosolen. Nach einer Inkubationszeit von einem bis vier Tagen treten zumeist plötzlich hohes Fieber, respiratorische Symptome, selten gastrointestinale Symptome sowie allgemeine Schwäche auf. Komplikationen können in Form von primärer Viruspneumonie oder sekundär bakterieller Pneumonie sowie Myokarditis oder selten Enzephalitis auftreten. Von Komplikationen sind sowohl Kleinkinder als auch ältere Menschen sowie immunsupprimierte Patienten betroffen. Dabei können auch fatale Verläufe auftreten.

### 2.3.6 Epidemiologie

Das natürliche Reservoir der aviären Influenzaviren (AIV) bilden wildlebende Vogelarten, die in oder an Gewässern leben, vor allem Gänsevögel (Ordnung Anseriformes) und sogenannte Watvögel (Ordnung Charadriiformes).

In diesen Wildvogelpopulationen zirkulieren AIV nahezu aller Subtypen in großer genetischer Vielfalt. In der Regel führen sie bei ihren natürlichen Wirten zu keinen Erkrankungen. Die Influenzaviren replizieren in erster Linie im Darm infizierter Wirtsvögel und werden zahlreich mit dem Kot ausgeschieden (WEBSTER *et al.* 1978).

Eine Neuinfektion erfolgt durch die orale Aufnahme der Erreger oder durch aerogene Aufnahme als Tröpfchen oder Aerosol. Dabei spielt die Virusübertragung über fäkal verunreinigtes Wasser eine epidemiologisch wichtige Rolle.

Viele Vogelarten stellen für Influenzaviren keine natürlichen Wirte dar beziehungsweise zeigen eine sehr unterschiedliche Empfänglichkeit für die Viren. Ist ein Influenzavirus für eine Vogelspezies hochpathogen, so kann es für eine andere Spezies harmlos sein (ALEXANDER *et al.* 1986). Unter den domestizierten Spezies gelten Puten und Hühner (Ordnung Galliformes) allgemein als hoch empfänglich für Erkrankungen mit Influenzaviren, sie stellen aber keine natürlichen Wirte dar (SPACKMAN 2008).

Beobachtungen zeigten, dass HPAI-Varianten hervorgehen können, wenn LPAI-Stämme aus Wildvogelpopulation in Hausgeflügelbestände, vornehmlich Hühner und Puten, eingeführt werden und mehrere Wirtspassagen durchlaufen. Hier wurden Mutationszeiträume von Wochen bis Jahren beobachtet (SPACKMAN 2008).

Es ist dabei unbekannt, weshalb bisher nur aus ursprünglich niedrigpathogenen H7- und H5-Subtypen HPAI-Varianten entstehen (SENNE *et al.* 1996, ALEXANDER 2000).

### 2.3.7 Aviäre Influenzaviren als Zoonoseerreger

Aviäre Influenzaviren wurden lange Zeit als für den Menschen ungefährlich betrachtet, da Menschen normalerweise nur an humanadaptierten Influenzaviren erkranken. AIV replizieren im Menschen nicht effizient (BEARE u. WEBSTER 1991) ebenso wenig bei anderen Primaten (MURPHY *et al.* 1982, BEARD *et al.* 1987).

Ein geringes Zoonosepotential konnte für Einzelfälle beschrieben werden, so wurde 1996 in Großbritannien ein H7N7-Geflügelinfluenzavirus bei einer Frau als Erreger einer Konjunktivitis isoliert (KURTZ *et al.* 1996).

1997 wurde in Hongkong erstmals ein schwerer Infektionsausbruch mit einem aviären Influenzavirus vom H5-Subtyp beim Menschen beobachtet. Im Rahmen eines akuten Seuchengeschehens mit einem hochpathogenen H5N1-Virus bei Hausgeflügel in Hongkong erkrankten 18 Personen an diesem Erreger, in sechs Fällen mit Todesfolge. Im Jahr 2003 erkrankten erneut zwei Personen in Hongkong an dem H5N1-Virus in einem Fall mit Todesfolge. Von diesem Zeitpunkt an erfolgte eine kontinuierliche Ausbreitung des H5N1-Erregers im asiatischen Raum und schließlich darüber hinaus. Zu Jahresbeginn 2009 ist H5N1 bereits in über 60 Ländern der Erde aufgetreten (OIE). In der Mehrzahl der betroffenen Länder wurde das Virus bei Infektionsausbrüchen in Hausgeflügelbeständen registriert.

Die Anzahl an humanen Infektionen mit dem H5N1-Erreger stieg ebenfalls an. Erkrankungsfälle wurden im Zeitraum 2003 bis 2008 vor allem aus Hongkong, Thailand, Vietnam, China, Kambodscha, Indonesien, Türkei, Irak u.a. gemeldet. Zu Beginn des Jahres 2009 (Stand vom 2.März) verzeichnete die WHO 409 bestätigte humane Infektionen mit dem H5N1-Erreger, in 256 Fällen mit Todesfolge.

Neben Infektionen des Menschen mit dem hochpathogenen H5N1-Virus sind weitere Infektionen mit niedrigpathogenen aviären H7- und H9-Subtypen bekannt.

**Tabelle 12: Übersicht der beim Menschen durch niedrigpathogene aviäre Influenzaviren verursachten Infektionen**

1996 UK	H7N7	1 Fall	KURTZ et al. 1996
1999 Hongkong	H9N2	2 Fälle	PEIRIS et al. 1999
2003 Niederlande	H7N7	89 Fälle	FOUCHIER et al. 2004; KOOPMANS et al. 2004
2004 Kanada	H7N3	2 Fälle	TWEED et al. 2004
2007 UK	H7N2	2 Fälle	ANON. 2007

Infektionen des Menschen mit AIV sind bisher in Folge engen, intensiven Kontaktes zu infiziertem Geflügel oder Geflügelprodukten hervorgegangen. Dabei bildet der Eintritt des Virus über die Schleimhäute des Respirationstraktes oder der Konjunktiven den Hauptinfektionsweg. Das Rupfen oder Schlachten von infizierten Tieren, das Verarbeiten von kontaminierten Geflügelprodukten, der Kontakt mit virushaltigen Exkrementen oder Exkreten bergen hohe Ansteckungsrisiken für den Menschen (ONER *et al.* 2006, DINH *et al.* 2006, AREECHOKCHAI *et al.* 2006, SEDYANINGSIH *et al.* 2007).

Der Übertragungsweg des H5N1-Virus erfolgte stets über Geflügel auf den Menschen. Die Vermutung einer Virusübertragung des Erregers von Mensch zu Mensch wurde für Einzelfälle bisher beschrieben (KANDUN *et al.* 2006, UNGCHUSAK *et al.* 2005). Die Personen infizierten sich jeweils nach intensivem Kontakt zu an H5N1-Virus erkrankten

Patienten. Eine effiziente Übertragung von AIV von Mensch zu Mensch ist bisher nicht aufgetreten.

Bei an Influenza erkrankten Patienten zeigten sich neben deutlich respiratorischen Symptomen in vielen Fällen auch Symptome einer Durchfallerkrankung (BUCHY *et al.* 2007, ABDEL-NASSER *et al.* 2008). Somit muss eine Übertragung des H5N1-Virus über infizierte Faeces daher auch für den Menschen in Betracht gezogen werden (RIMMELZWAAN *et al.* 2006).

Die Infektion des Menschen über den Gastrointestinaltrakt durch orale Aufnahme des Influenzavirus und der Eintritt des Virus direkt über das Intestinum konnte bisher jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Für Geflügel jedoch stellt die Virusaufnahme über den Darm eine der Hauptinfektionsrouten mit dem Erreger dar (ALEXANDER 1993).

Im Jahr 2003 erfolgte erstmals ein Report über fatale Infektionen von Großkatzen (zwei Tiger und zwei Leoparden) mit dem H5N1-Virus aus einem Zoo in Thailand. Die Tiere wurden zuvor mit virushaltigem Geflügelfleisch gefüttert (WHO 2008).

Für Katzen und andere Karnivoren konnte ebenfalls eine Infektion mit Influenza nach oraler Virusaufnahme beschrieben werden (THIRY *et al.* 2007). In experimentellen Studien mit dem H5N1-Erreger erkrankten Katzen an dem Virus nach Verfütterung virushaltigen Hühnchenfleisches. Eine Virusausscheidung über die Faeces konnte bestätigt werden (RIMMELZWAAN *et al.* 2006).

Ebenfalls konnte ein Fall einer fatalen H5N1 Erkrankung für einen Hund beschrieben werden, der nach Aufnahme kontaminierten Entenfleisches hohes Fieber zeigte und anschließend verstarb (SONGTERM *et al.* 2006).

Nach intranasaler Applikation erkrankten auch Frettchen und Mäuse an dem H5N1-Erreger, wobei das Virus bei beiden Tierarten im Verlauf der Erkrankung auch im Darm nachzuweisen war (ZITZOW *et al.* 2002, GAO *et al.* 1999).

Der H5N1-Erreger wurde als Todesursache auch bei Hauskatzen und Steinmarder nachgewiesen, die in entsprechenden Ausbruchsgebieten aufgefunden wurden (FLI 2006).

Für den Menschen wird der Rohverzehr von möglicherweise infizierten Geflügelprodukten in jedem Fall als potentiell hohes Risiko eingestuft. Die Virusaufnahme beim Rohverzehr von Geflügel kann neben dem oralen Weg auch über den oberen Respirationstrakt erfolgen (RIMMELZWAAN *et al.* 2006). Bei experimenteller oraler Infektion von Katzen mit dem H5N1-Virus konnte nach der Verabreichung virushaltigen Fleisches die Möglichkeit einer

Virusaufnahme über den Respirationstrakt nicht gänzlich ausgeschlossen werden (RIMMELZWAAN *et al.* 2006).

### **2.3.8 Infektionsgefahr durch Verzehr kontaminierter Geflügelprodukte**

Geflügel, das an HPAI erkrankt, weist in aller Regel systemische Infektionen mit dem Virus auf. Der Erregernachweis ist in verschiedenen Geweben möglich (SWAYNE u. HALVORSON 2003). So konnten im Muskelfleisch von infizierten Hühnern, Enten und Wachteln Virusmengen von  $10^{7,2}$  EID<sub>50</sub> pro Gramm Muskel nachgewiesen werden (SWAYNE u. BECK 2005, ANTARASENA *et al.* 2006).

Influenzaviren können in schlachtfischem Geflügelfleisch besonders unter Kühlung oder auch Gefrierung ihre Infektiosität für eine gewisse Zeit erhalten und so über die Vermarktung und Handel des kontaminierten Fleisches weiterverbreitet werden (WHO 2007). So wurde beispielsweise 2001 in Korea bei importierten Pekingenten aus China ein H5N1-Virus isoliert. In nachfolgenden Untersuchungen konnte das Isolat als HPAI klassifiziert werden, welches nach experimenteller Infektion effizient in Hühnern replizieren konnte und welches große genetische Ähnlichkeit mit dem 1997 in Hong Kong zirkulierenden, humanpathogenen H5N1-Virus aufwies (TUMPEY *et al.* 2002).

Im Jahr 2003 wurde in Japan ebenfalls ein H5N1-Virus in importiertem Entenfleisch aus China gefunden (MASE *et al.* 2005). In weiterführenden Untersuchungen konnte das Isolat nach den Vorgaben der OIE ebenfalls als HPAI charakterisiert werden. Eine phylogenetische Analyse ergab deutliche Unterschiede im Genom des Isolats zu bereits bekannten H5N1-Genotypen.

In Italien wurden im Rahmen von regionalen Veterinärkontrollen illegal eingeführte Geflügelwaren aus China entdeckt. Aus den gefrosteten Geflügelteilen von Enten und Puten konnte ein H10N7-Virus isoliert werden (BEATO *et al.* 2006). Auch wenn sich bei der Bestimmung des Intravenösen Pathogenitätsindex (IVPI) ein Wert von 0,0 für das Isolat ergab, so verdeutlicht dieser publizierte Fall beispielhaft die große Gefahr der Viruseinschleppung durch illegale Geflügelimporte.

Welches Risiko die Verfütterung von Geflügelfleisch an Hausgeflügel bergen kann, verdeutlicht jüngst eine Veröffentlichung aus Deutschland. Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen einer Ausbruchsserie mit dem Influenzavirus H5N1 bei deutschen Kleinstbetrieben im Winter 2007 mit dem H5N1-Ausbruch in einem deutschen Großbetrieb im Sommer des gleichen Jahres aufgezeigt werden (HARDER *et al.* 2009). Zunächst legten phylogenetische Untersuchungen der



gewonnenen Influenzaisolate einen epidemiologischen Zusammenhang der beiden Ausbruchsserien nahe. Weitere Ermittlungen ergaben daraufhin die illegale Verfütterung von Entenfleischabfällen in den Kleinhaltungen. Das Entenfleisch war zuvor bei einer Supermarktkette zum Eigenverzehr gekauft worden. Die Rückverfolgung des vermarkteten Entenfleisches führte zu einem Schlachtbetrieb, in dem auch Tiere des betroffenen Großbetriebes geschlachtet wurden.

Diese Umstände lassen den kurzzeitigen Eintrag von HPAI in die Lebensmittelkette in Form gefrorener Entenfleischkarkassen mit hoher Wahrscheinlichkeit annehmen, resultierend in einem weiteren Ausbruchsgeschehen bei Hausgeflügel nach illegaler Verfütterung von entsprechenden, unerhitzten Fleischresten.

Die Gefahr eines Eintrags von HPAI in die Lebensmittelkette besteht somit prinzipiell, wenn unerkannt infiziertes Geflügel zur Schlachtung gelangt. Dies gilt im Inland wie im Ausland.

Um das Risiko einer Infektion mit Influenzaviren beim Verzehr von Geflügelfleisch zu vermeiden, empfiehlt die WHO ein gründliches Durcherhitzen von Geflügelfleisch vor dem Verzehr. Eine Temperatur von 70 °C soll dabei im Kern der Produkte erreicht werden, um das Virus sicher zu inaktivieren. Auf die Einhaltung strenger Hygienemaßnahmen beim Umgang mit rohen Geflügelfleischprodukten wird besonders für Ausbruchgebiete mit Influenza hingewiesen.

### **2.3.9 Tenazität**

Behüllte Viren zeigen sich gegenüber äußeren Einflüssen wie Hitze, saurem pH-Wert, Trockenheit etc. empfindlicher als unbehüllte Vertreter. So gelten Orthomyxoviren als allgemein sensibel gegenüber sauren pH-Werten. Der Erhalt der Infektiosität hängt dabei sowohl vom Grad der Säuerung ab als auch vom jeweiligen Virusisolat (PURI *et al.* 1990).

In Studien zum Einfluss des pH-Wertes auf Influenzaviren wurden zuweilen unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Nach CASTRO *et al.* (1998) und LU *et al.* (2003) konnte nach einer 15-minütigen Inkubation mit einem pH von 5,0 kein Infektiositätsverlust bei vier Influenzaisolaten vom Typ H7N2 festgestellt werden. In Studien von SHAHID *et al.* (2009) wurde eine Inaktivierung eines H5N1-Isolats nach 24 h bei pH 5,0 beobachtet. Bei einem pH-Wert um 7,0 und 9,0 erfolgte im gleichen Zeitraum kein Infektiositätsverlust.

In Untersuchungen zum Einfluss des Salzgehaltes auf AIV konnte gezeigt werden, dass sich mit Erhöhung des Salzgehaltes die Inaktivierung beschleunigte. Ebenso verkürzten höhere Temperaturen die Infektionsdauer der Viren. Die stärkste Reduktion der Infektiosität wurde

bei niedrigem pH-Wert und hohen Temperaturen beobachtet (STALLKNECHT *et al.* 1990a, BROWN *et al.* 2007).

Die Studien von Stallknecht *et al.* (1990a, b) und Brown *et al.* (2007) zeigten weiterhin, dass deutliche Unterschiede hinsichtlich der Tenazität der einzelnen AIV-Isolate bestehen. HPAI-Isolate zeigten dabei nicht zwingend eine höhere Stabilität als LPAI-Isolate. Die Ursachen für die Heterogenität von Influenza A-Viren hinsichtlich ihrer Tenazitätseigenschaften sind weitgehend unbekannt.

**Tabelle 13: Übersicht zu Tenazitätsstudien mit aviären Influenzaviren**

Influenzavirus Subtyp	Untersuchung		Beobachtung	Autor
5 LPAI Isolate  H3N8, H4N6, H6N2, H12N5, H10N7	Tenazität in Wasser  Isolate bei zwei Temperaturen: 17 °C u. 28 °C in Wasser inkubiert	Erstellung eines linearen Regressionsmodells für den Titerverlauf	Tenazität:  bei 17 °C 126 bis 207 d  bei 28° C 30 bis 102 d  dtl. Unterschiede in der Tenazität der Isolate	STALLKNECHT <i>et al.</i> , 1990 b
8 LPAI Isolate  H7N3, H7N4, H5N2, H5N3, H5N7, H5N8  2 HPAI Isolate  H5N1	Tenazität in Wasser  Isolate bei zwei Temperaturen: 17 °C u. 28 °C und Salzkonzentrationen von 0 %, 1,5 %, 3 % inkubiert	Beobachtung Titerverlauf	Tenazität:  bei 17°C längere Persistenzzeiten als bei 28°C  Erhöhung des Salzgehaltes führt zu schnellerer Inaktivierung	BROWN <i>et al.</i> , 2007
3 LPAI Isolate  H4N6, H6N2, H10N7	Tenazität in Wasser  Isolate bei zwei Temperaturen: 17 °C u. 28 °C und Salzkonzentrationen von 0 %, 2 % und pH-Werten von 6,2; 7,2; 8,2 inkubiert	Beobachtung Titerverlauf	Inaktivierung:  am schnellsten bei 28°C, 2 % Salz, pH 8,2  am langsamsten bei 17°C, 0 % Salz, pH 8,2  Erhöhung von Temperatur und Salzkonzentration beschleunigt Inaktivierung	STALLKNECHT <i>et al.</i> , 1990 a

Fortsetzung Tabelle13

1 LPAI Isolat H7N2	Tenazität in organischem Mist  Isolat bei zwei Temperaturen: 4 °C u. 20 °C in Hühnermist inkubiert	Beobachtung Virusinaktivierung	Inaktivierung  bei 4 °C Keine Virusinaktivierung nach 20 d  bei 15- 20 °C Virusinaktivierung binnen 1 Woche	Lu <i>et al.</i> , 2003
1 HPAI Isolat H5N2	Tenazität in Kot  Isolat im Kot natürlich infizierter Hühner bei 4 °C und 25°C inkubiert	Beobachtung Virusinaktivierung	Infektiösität:  bei 4 °C bis d 35 erhalten  bei 25 °C Inaktivierung nach 2 d	BEARD <i>et al.</i> , 1984
2 Human-Isolate H1N1, H2N2	pH- abhängige Inaktivierung  Untersuchung der Isolate bei verschiedenen. pH- Werten	pH- abhängiges Inaktivierungsmodell mit $pK_i$ / $pK_a$	$pK_i$ (pH bei dem HA zu 50 % inaktiviert ist) $pK_i$ 4,8- 4,9  $pK_a$ (pH bei dem HA zu 50 % aktiviert ist) $pK_a$ 5,6– 5,7	MITTAL <i>et al.</i> , 2002
Isolate der Subtypen:  H 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11	pH- abhängige Inaktivierung  einstündige Inkubation bei 20 °C mit verschiedenen pH- Werten, in Abstufung von 0,1 bis 0,2 pH- Einheiten	Beobachtung Inaktivierung	H3-Subtypen relativ stabil- Inaktivierung zw. pH 5,1- 5,4  H5- und H7- Subtypen labil- Inaktivierung zw. pH 5,6 – 6,0  H1- Subtypen von mittlerer Stabilität	SCHOLTISSEK <i>et al.</i> , 1985
4 LPAI Isolate H7N2	Inaktivierung durch pH-Wert  Inkubation bei pH- Werten von: 2, 5, 7, 10, 12	Beobachtung Inaktivierung	Inaktivierung bei pH 2 nach 5 min  Infektiösität erhalten bei pH 5, 7, 10, 12 nach 15 min	CASTRO <i>et al.</i> , 1998  LU <i>et al.</i> , 2003

Fortsetzung Tabelle 13

1 HPAI Isolat H5N1	Inaktivierung durch Erhitzung  Erhitzung virushaltigen Hühnchenfleisches bei verschiedenen Temperatur/Zeit-Kombinationen	Prüfung verschiedener Temperatur/Zeit-Kombinationen für Inaktivierung	mit Anstieg der Erhitzungs-temperatur beschleunigt sich Inaktivierung, effiziente Inaktivierung um 11 log Stufen bei 70 °C für 5,5 sec	THOMAS u. SWAYNE, 2008
1 HPAI Isolat H7N7	Inaktivierung durch Hochdruck  Druckbehandlung virushaltigen Hühnchenfleisches im Bereich von 0,1 - 500 MPa, bei verschiedenen Temperaturen	Erstellung eines Druck- Temperatur Modells zur Inaktivierung	ab Drücken von 300 MPa effektive Inaktivierung, bei gleichem Druck beschleunigte Inaktivierung durch höhere Temperatur, Reduktion um 1,5 log Stufen bei 1min mit: 15 °C u. 400MPa 30 °C u. 300MPa	ISBARN <i>et al.</i> , 2007

## 2.4 Rohwurst

### 2.4.1 Begriff

Rohwürste unterscheiden sich von anderen Wurstwaren wie beispielsweise Koch- oder Brühwürsten dadurch, dass sie im Herstellungsprozess keine Hitzebehandlung erfahren. Es handelt sich um begrenzt haltbargemachte Rohfleischprodukte von artspezifischem Charakter (WILKE 1992), bei denen besonderes Augenmerk auf mikrobiologische Beschaffenheit zu legen ist (LEISTNER 1985).

Unter dem Begriff „Rohwurst“ werden gemäß den Leitsätzen für Fleisch und Fleischerzeugnisse / Deutsches Lebensmittelbuch (2008), Absatz 2.21, Wurstwaren verstanden, welche in der Regel umgerötet und ungekühlt lagerfähig zum Rohverzehr gelangen. Es werden streichfähige und schnittfeste Rohwurstwaren unterschieden.

Bei streichfähiger Rohwurst handelt es sich den Leitsätzen nach um sortenabhängig gereifte, umgerötete, jedoch nur gering abgetrocknete Würste / Fleischerzeugnisse, die nicht zur längeren Lagerung bestimmt sind (Leitsatz 2.212).

Schnittfeste Rohwürste sind gereifte Fleischerzeugnisse, die ohne Kühlung lagerungsfähig sind (Leitsatz 2.211).

Zur Herstellung von Rohwürsten werden rohes Fleisch zumeist von Schwein und Rind sowie Speck, zumeist Rückenspeck, eingesetzt.

#### **2.4.2 Herstellung**

Kochsalz wird in Rohwürsten, je nach Sorte, in Mengen von 2,5 bis 3 % zugesetzt (LEISTNER 1985). Zum einen dient das Salz der Geschmacksgebung, zum anderen liegt die Wirkung des Kochsalzes darin, dem Fleisch Wasser und darin gelöste Eiweißbestandteile zu entziehen, was zu einer Verfestigung der Brätmasse führt. Dabei wird der  $a_w$ -Wert (Wasseraktivitätswert, Maß zur Angabe des freiverfügbaren Wassers in Lebensmitteln) abgesenkt und somit die Vermehrung unerwünschter Mikroorganismen gehemmt.

Die Anwendung von Pökelsalz (Kochsalz in Kombination mit Nitrit oder Nitrat) bewirkt eine stabile Umfärbung (Umrötung) der Produkte, hat antioxidative und konservierende Wirkungen und dient ebenfalls der Geschmacksgebung. Das Pökeln beeinflusst die mikrobielle Flora im Produkt über eine Verminderung der Wasseraktivität und über die Nitrit eigene antimikrobielle Wirkung basierend auf der Hemmung von Enzymen, der Bindung von Eisen und der Beeinflussung von Elektronentransporten (WIRTH 1980). Bei Nitritzugaben von 200 mg/kg werden bereits viele Gram-negative Keime gehemmt (HILDEBRANDT 2004).

Während sich das Pökeln auf einige wichtige Parasiten wie Toxoplasmen und Sarkosporidien bereits in gewerbeüblichen Konzentrationen inaktivierend auswirkt, konnte gegenüber MKS- und Schweinepest-Viren kein Einfluss beobachtet werden (HILDEBRANDT 2004).

Der Zusatz von Ascorbinsäure oder Natrium-Ascorbat liegt in der Wirkung als Reduktionsmittel sowie der Wirkung von Ascorbinsäure als Antioxidans.

Die Zugabe von Glucono-delta Lacton (GdL) fördert die Absenkung des pH- Wertes im Produkt und damit auch den Prozess der Umrötung. GdL wird vor allem bei schnellgereiften Rohwürsten zur raschen Ansäuerung eingesetzt.

Mit der Schaffung eines sauren Milieus durch die gezielte Ansäuerung mit GdL oder über milchsäurebildende Bakterien wird die Vermehrung unerwünschter Keime, vor allem Gram-negativer Stäbchen und Bazillen, unterdrückt.

Gewürze werden bei Wurstwaren zur Geschmacksgebung zugesetzt, darüber hinaus entfalten sie aber auch antimikrobielle oder oxidative Wirkungen. Antimikrobielle Substanzen von Gewürzen werden als Phytozine bezeichnet, sie sind zumeist an die in Gewürzen enthaltenen ätherischen Öle gebunden. Starke antimikrobielle Wirkungen zeigen beispielsweise Thymian, Nelken oder Paprika.

Mit der Zugabe von so genannten Starterkulturen kann die Reifung der Rohwürste gezielt gefördert werden. Dabei handelt es sich um selektierte Mikroorganismen in Rein- oder Mischkultur, die Lebensmitteln mit der Absicht zugesetzt werden, Geschmack, Geruch, Aussehen, Konservierung zu verbessern (STIEBING 1998). Die eingesetzten Starterkulturen dürfen selbst nicht pathogen oder toxinogen sein (LÜCKE u. HECHELMANN 1985). Überwiegend werden Mischkulturen eingesetzt, häufig Kombinationen aus Laktobazillen/ Pediokokken- und Mikrokokken/Staphylokokken-Spezies (GEISEN *et al.* 1990).

### 2.4.3 Reifung

Je nach Zeitdauer des Reifungsprozesses kann eine schnelle, mittlere oder langsame Reifung unterschieden werden (RÖDEL 1985). Gesteuert wird die Reifung über externe Faktoren wie die relative Luftfeuchtigkeit, Temperatur und Luftgeschwindigkeit sowie interne Faktoren wie Salzgehalt und Zuckergehalt, Fettanteil im Produkt, Zerkleinerungsgrad, Kaliber sowie Starterkulturen. Bei der schnellen Reifung wird durch eine rasche pH-Wertabsenkung binnen weniger Tage ein verzehrsfertiges Produkt bei relativ hohem  $a_w$ -Wert hergestellt. Bei der langsamen Reifung laufen Säuerungsprozesse durch niedrigere Reifetemperaturen allmählich ab, so dass eine zunehmende Abtrocknung der Produkte erzielt wird (RÖDEL 1985).

**Tabelle 14: Zielvorgaben für Wasseraktivitäts- und pH-Wert von Rohwurstendprodukten**

	pH- Wert	Wasseraktivität
schnellreifende Rohwurst	< 5,0	0,95- 0,90
langsamreifende Rohwurst	5,3- 5,8	0,90- 0,65
streichfähige Rohwurst	< 5,5	0,94- 0,91

(modifiziert nach LEISTNER, 1986)

Da bei schnellgereiften Rohwürsten Fermentation und Umrötung binnen kurzer Zeiträume ablaufen, eine Abtrocknung aber nur in geringem Maße stattfindet, ist die schnelle Absenkung des pH-Wertes für die mikrobielle Stabilisierung von besonderer Wichtigkeit. Dagegen spielt bei langgereiften Würsten die Absenkung des  $a_w$ -Wertes die primär wichtigste Stabilisierungsmaßnahme (LEISTNER 1985).

#### 2.4.4 Keimflora

Im Herstellungsprozess von Rohwurstprodukten spielen Mikroorganismen eine entscheidende Rolle. Während der Reifung gilt es, unerwünschte Keime zu unterdrücken und erwünschte Mikroorganismen und ihre fermentativen Eigenschaften gezielt zu fördern (CORETTI 1971). Schlachtfrisches Fleisch, gewonnen unter hygienischen Bedingungen, weist in der Regel geringe Keimzahlen von unter  $10^4$  KbE/cm<sup>2</sup> auf wobei Mikrokokken und Hefen überwiegen (LÜCKE 1985). Unter Kühlung vermehren sich unter aeroben Bedingungen vor allem Pseudomonaden oder einige Arten der *Enterobacteriaceae*, unter anaeroben Bedingungen Laktobazillen. Wie gut sich dabei Laktobazillen gegenüber anderen Bakterien durchsetzen können, hängt neben der anfänglichen Anzahl dieser Milchsäurebildner von der Temperatur, dem pH-Wert und der Verfügbarkeit von fermentierbaren Kohlehydraten im Wurstbrät ab (LÜCKE 1985). In den ersten Tagen der Reifung findet üblicherweise eine Vermehrung der Laktobazillen bis auf bis zu  $10^8$  KbE/g statt (LÜCKE 1985). Diese Zahl sinkt mit fortschreitender Reifedauer wieder ab.

Somit zeichnet sich die Keimflora ausgereifter Rohwürsten typischerweise durch hohe Gesamtkeimzahlgehalte aus, wobei Gram-positive Spezies (Laktobazillen, Mikrokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Pediokokken) dominieren. Pseudomonaden und *Enterobacteriaceae* sind zu Beginn häufig im Brät nachzuweisen, sie sollten zu Beginn der Reifung jedoch stark in der Keimzahl zurückgehen (HECHELMANN u. KASPROWIAK 1991).

Zu den pathogenen Keimen, die in Rohwürsten auftreten können, zählen vor allem Salmonellen, *Staphylococcus aureus*, Listerien und Enterohämorrhagische *Escherischia coli*. Durch den Verzehr kontaminierter Minisalamis wurde 2007 ein überregionaler Infektionsausbruch mit Salmonellen bei über 50 Personen hervorgerufen (RKI 2007). Nach einem Nachweis von Enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) in Rohwürsten, musste in Österreich 2008 entsprechende Ware aus dem Handel zurückgerufen werden (AGES 2008). Auch werden Listerien immer wieder in Rohfleischerzeugnissen und Rohwurst gefunden (BfR 2009).

Das Wachstum pathogener Keime wird bei der nach guter Herstellungspraxis hergestellten Rohwürsten im konventionellen Bereich durch Verwendung von Pökelfstoffen, Säuerung, Reifungsflora sowie der mit der Reifung verbundenen Abtrocknung bei schnittfesten Rohwürsten ausreichend gehemmt. Inwieweit sich das Hürdenprinzip zur mikrobiellen Stabilisierung bei Rohwürsten auch auf die Hemmung bzw. Inaktivierung von viralen Erregern anwenden lässt, ist bis dato wenig erforscht.

## 2.5 Arbeitsplan

Dass verschiedenste Lebensmittel Infektionsquellen viraler Infektionen des Menschen darstellen können, ist längst bekannt. Die Kontamination der Lebensmittel mit Viren kann auf dem primären oder sekundären Weg erfolgen. Im Zusammenhang mit der Übertragung humanpathogener lebensmittelassoziierter Viren, werden Fleischerzeugnisse derzeit zunehmend diskutiert, nicht zuletzt auch durch das Auftreten des Influenza-Virus H5N1-Asia.

Dass vor allem Rohfleischerzeugnisse aufgrund eines fehlenden Erhitzungsprozesses ein erhöhtes Infektionsrisiko bergen, ist beispielsweise in Zusammenhang mit Erkrankungen des Menschen an Salmonellen, Listerien oder EHEC nach Verzehr solcher Produkte bekannt. Während zahlreiche Studien zu Vorkommen und Beeinflussbarkeit bakterieller Erreger in verschiedenen Rohfleischerzeugnissen vorliegen, gibt es dagegen wenige Erkenntnisse zum Auftreten und Überdauern von Viren in Rohfleischerzeugnissen sowie möglichen Inaktivierungsmechanismen.

Im Verlauf dieser Arbeit sollten Erkenntnisse hinsichtlich der Tenazität und Inaktivierung aviärer Inflenzaviren und ECHO- Viren in Rohfleischerzeugnissen gewonnen werden.

*In vitro* wurde gezielt der Einfluss der rohwurstspezifischen Parameter D/L-Milchsäure und Natriumchlorid beziehungsweise Natriumnitrit auf die Virusinaktivierung untersucht. In Versuchsreihen mit Rohwürsten sollten Daten zur Tenazität der Viren in diesen Produkten ermittelt werden, es wurden sowohl kurz- als auch langgereifte Rohwürste hergestellt und über den Verlauf der Reifung und Lagerung untersucht.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit sollte zu einer objektiven Risikobewertung des Lebensmittels Rohwurst als Infektionsquelle lebensmittelassoziierter Virusinfektionen beigetragen werden. Mögliche Maßnahmen zur Beeinflussung von Viren in Rohwurstprodukten sollten erörtert werden.



## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Modellviren**

In den Studien wurden folgende Viren eingesetzt:

ECHO 1, Stamm Farouk von Dr. J. Steinmann, Mikrolab GmbH, Bremen.

Aviäres Influenzavirus (AIV) H3N8 A/duck/Ukraine/1/63 und H5N6 A/duck/Potsdam/2216/84 von PD Dr. T. Harder, FLI, Greifswald - Insel Riems.

#### **3.1.2 Zellen**

Die Vermehrung und der Nachweis von ECHO-Virus erfolgte unter Verwendung der permanenten Zelllinie Buffalo Green Monkey (BGM) Cells. Die Morphologie der Zellen mit und ohne Virus-cpe ist im Anhang dargestellt.

#### **3.1.3 Bruteier**

Die Vermehrung und der Infektiösitätsnachweis der Influenzaviren erfolgten in 9 bis 11 Tage bebrüteten, embryonierten Hühnereiern (Bezug von Fa. Kürbis, Wurgwitz bei Dresden).

#### **3.1.4 Rohmaterial zur Herstellung von Rohwürsten**

Das standardisierte Fleisch für die Herstellung der Rohwürste (Schweinefleisch der Kategorie S I, Rindfleisch R I, Putenoberkeulenfleisch und Rückenspeck V) wurde von der Firma Schafft, Ansbach, zur Verfügung gestellt. Das im Betrieb vorgewolfte Rohmaterial wurde in gefrorenem Zustand angeliefert und bei -20 °C in der Gefrierzelle für die Versuchsreihen gelagert.

Die verwendeten Wursthüllen für die kurzgereiften Rohwürste (Nalo Zellulosehydrat-Hüllen, Kaliber 38) und langgereiften Rohwürste (Nalo Faser I, Kunststoffdarm, farblos, Kaliber 40) stammten von der Firma Kalle, Wiesbaden.

### 3.1.5 Geräte, Laborbedarf, Reagenzien etc.

Tabelle 15: Übersicht Geräte, Laborbedarf, Reagenzien, Kits

Geräte	
a <sub>w</sub> Meter	Aqualab
Kutter	Cutter FGC 10-2 Firma FEUMA
Wurstabfüllgerät	Wurstfüller, Edelstahzylinder, Firma Westfalia
Reife-/Räucherschrank Universalanlage	Universalanlage, Firma Brökelmann
Umlaufkühler	IDROBLOC, Firma Elektro- und Kältetechnik Kleinehr GmbH
Stomacher	Laboratory Blender 400, Firma Seward
Zentrifuge	Biofuge fresco, Haereus Instruments Biofuge Stratos, Haereus Instruments
Waage	BL 1500, Firma Satorius
Vakuumiergerät	Firma Lava Vakuumverpackung
Pipettierhelfer	StarPet Pipette Controller, Firma Starlab
Sterilwerkbänke	Haereus, Kojair
Mikroskop	Leica DM IL, Leica Microsystems GmbH Wetzlar
Kamera	Leica DC 180, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Schweiz
Brutschrank Eier	Hekea Brutgeräte, Rietberg, Deutschland Incubatrici Maino Enrico, Italy
pH Meter	VWR International symPHony S890 MS
Real time PCR-Cycler	Stratagene MX 3000 P mit Software des Herstellers
Elektrophoresegerät	Power Pack 200, Firma BioRad
UV-Transluminator	GelDoc 2000, Firma BioRad mit Software „Quantity one 4.1.1“ BioRad
Laborbedarf	
Stomacherbeutel	Bag Light 20 x 25, 400 ml, Firma Transia
Sterile Einmalpipetten	1 ml, 5 ml, 10 ml, Firma LP ITALIANA SPA
Spritzenvorsatzfilter	0,22 µl, Firma TPP AG
Sterile Spritzen	2, 5, 10 ml, B. Braun AG, Melsungen, Germany
Kanülen	24 G x 1, Sterican
Schraubröhrchen	15 ml, 50 ml, Firma TPP AG
Zellkulturflaschen	Firma TPP AG
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries USA, VWR international
Pipetten	Firma Eppendorff
Eppendorffgefäße	1,5ml und 2ml, Firma TPP AG
Petrishalen	Firma TPP AG
Reagenzien/ Puffer/ Medien	
PBS	Rezeptur siehe Anhang
Zellkulturmedium	Dulbeccos Minimal essential medium (MEM), Biochrom AG, Berlin
Trypsin 1:250	Biochrom AG, Berlin
NEA	Biochrom AG, Berlin
FKS	Biochrom AG, Berlin
Streptomycin/Penicillin	Biochrom AG, Berlin
Natriumchlorid	> 99,8% Art.-Nr. 9265.1 Firma Roth
Natriumnitrit, reinst	Art.-Nr. 1.06544.1000 Firma Roth
Natrium (L)- Ascorbat	Art.-Nr. 5048.0100, Firma Diagonal
Glucono-delta-Lacton	F2500 Firma Jungbunzlauer
D/L- Milchsäure	90% synthetisch, Carl Roth GmbH.
Pfeffer, schwarz, gemahlen	SCHUCO Gewürze, Nürnberg

---

**PCR**

---

PCR Kits	Quantitect Sybr RT- PCR Kit, Firma Qiagen Quantitect Probe RT- PCR Kit, Firma Qiagen
Primer	Firma Biomers
DNA- Marker	DNA 50 bp, Firma Peqlab

---

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkultur BGM**

Die Anzucht der permanenten BGM Zellen wurde in Vent-Zellkulturflaschen durchgeführt. Das Zellkultur-Medium wurde mit fetalem Kälberserum zu einem Anteil von 10 %, mit nichtessentiellen Aminosäuren und Glutamin zu einem Anteil von jeweils 1 % angereichert. Pro ml Medium wurden 100 IE Penicillin und 100 µg Streptomycin zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Subkultivierung wurde verbrauchtes Medium dekantiert und der Zellrasen mit 0,025 % Trypsin-haltiger Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C mit Trypsinlösung solange inkubiert, bis sich der Zellrasen leicht vom Flaschenboden ablöste. Danach wurden die Zellen mittels Pipette unter Zugabe einiger Milliliter Zellkulturmedium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension wurde anschließend in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Zur Bestimmung des Infektiositätstiters wurde die Zellsuspension bis zu einer Konzentration von  $1-2 \times 10^5$  Zellen / ml in Medium verdünnt. Die Zellzählung erfolgte dabei mittels Neubauer-Zählkammer. Anschließend wurde die Zellsuspension auf einer 96 well-Platte zu je 100 µl pro Kavität aufgetragen. Die Platten wurden bei 37 °C bis zum folgenden Tag für die Beimpfung mit dem Virus inkubiert.

### **3.2.2 Vermehrung von ECHO-Virus**

Zur Vermehrung der ECHO-Viren wurden frisch passagierte BGM-Zellen nach Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens mit einer Stammvirussuspension beimpft. Es folgte eine Inkubation der Zellkultur bei 37 °C bis zum Auftreten eines cytopathischen Effekts (cpe) bei ca. 80 bis 90 % der Zellen. Anschließend erfolgte ein Zyklus aus Tiefgefrieren und Auftauen der Kultur. Der Zelldetritus wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 498 x g abgetrennt und der virushaltige Überstand aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Der Virustiter wurde durch Titration in Zellkultur bestimmt.

### 3.2.3 Bestimmung des Infektiösitätstiters

Für die Bestimmung der infektiösen Dosis 50 des ECHO-Virus in Gewebekultur (Tissue Culture infectious dose -TCID<sub>50</sub>) wurden die Zellen einen Tag vor Infektion in 96-well Platten subkultiviert.

Die Virussuspension beziehungsweise die virushaltigen Versuchslösungen wurden zunächst in einer separaten Platte mit PBS vortitriert. Die Verdünnung erfolgte in 10er-Schritten bis zur Verdünnungsstufe 10<sup>-10</sup>. Anschließend wurden je 100 µl der Verdünnungsstufen auf die Zellkulturplatte übertragen. Die Zellkulturplatten wurden bei 37 °C inkubiert und der auftretende cpe nach vier Tagen unter lichtmikroskopischer Betrachtung abgelesen. Digitale Aufnahmen der Zellkulturen erfolgten bei 40-facher mikroskopischer Vergrößerung (Leica DC 180, Leica Mikrosystems). Zur Dokumentation und Archivierung der Aufnahmen wurde das dazugehörige Programm Leica IM 50 verwendet. (Die Darstellung der Zellkultur sowie des cpe mit ECHO-Virus befinden sich im Anhang).

Die Berechnung des Titers als TCID<sub>50</sub>/ml erfolgte nach der Methode von SPEARMAN und KAERBER (1908, 1931).

### 3.2.4 Vermehrung, Nachweis und Titration von Influenzaviren

Die Eier für Virusvermehrung und -nachweis wurden zunächst für neun bis elf Tage bei 37 °C im Brutschrank bebrütet. Nach dem Schieren erfolgte die Infektion der Eier nach der CAS (chorioallantoic sac)-Methode. Mittels einer 24x1 G-Kanüle wurden je 200 µl Virus- oder Probensuspension in senkrechter Einstichrichtung in die Chorioallantoishöhle injiziert.

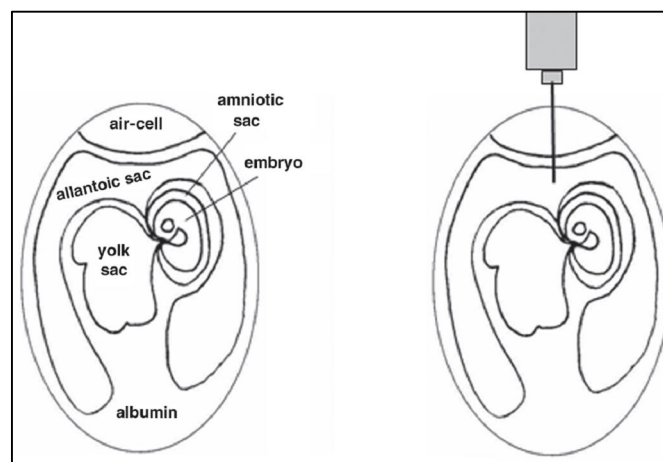


Abbildung 1: CAS Methode (chorioallantoic sac) zur Beimpfung embryonierter Hühnereier (nach SPACKMAN et al. 2008)

Nach drei Tagen Bebrütung wurden die Eier für 24 bis 48 Stunden bei 4 °C gekühlt. Die Virusernte erfolgte unter der Sterilwerkbank. Die Allantoisflüssigkeit wurde mittels Einmalpipetten aus den infizierten Eiern gewonnen.

Mittels Hämagglutinationstest (HA-Test) wurde die Allantoisflüssigkeit auf den Virusgehalt geprüft. Hämagglutinin-positive Allantoisflüssigkeiten wurden gepoolt, aliquotiert und bei – 80 °C gelagert. Die Ermittlung des Infektiösitätstiters erfolgte wiederum im Hühnerei.

Für die Testdurchführung wurden humane Erythrozyten der Blutgruppe 0 (Haema AG Leipzig) in einer 0,5 % Konzentration mit PBS eingesetzt.

Für den HA Test wurden 96-well Platten mit V-Boden verwendet. Es wurden zunächst 25 µl PBS in jeder Kavität vorgelegt. Mit einem Volumen von je 25 µl wurden die zu untersuchenden Allantoisflüssigkeiten in der Platte titriert. Es folgte die Zugabe weiterer 25 µl PBS pro well sowie von 50 µl Erythrozytensuspension. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurde der Test in Hämagglutinationseinheiten abgelesen.

Nachdem in Vorversuchen die Titration der Influenzavirusisolate in Zellkultur (permanente Zelllinie, Madin Darbey kidney cells, MDCK) stets geringere Virustiter als die vergleichsweise Titration im Brutei hervorbrachte, wurde von dem Infektiösitätsnachweis der Viren mittels Zellkultur abgesehen. Der Nachweis der Infektiösität wurde in Hühnereiern geführt. Obwohl sich diese Methode des Virusnachweis durch einen hohen Zeit- als auch Arbeitsaufwand auszeichnet, ist sie eine der sensitivsten Methoden, um infektiöse Influenzaviren nachzuweisen (SPACKMAN *et al.* 2008). Das Virus wurde in PBS vortitriert, das in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit einem Volumen von 900 µl vorgelegt wurde. Die Verdünnung erfolgte in log<sub>10</sub>-Stufen. Anschließend erfolgte die Infektion der Eier mit den entsprechenden Verdünnungsstufen.

Nach einer Bebrütungszeit von 72 bis 96 Stunden mit anschließender Kühlung bis 48 Stunden bei 4 °C erfolgte die Auswertung. Nach makroskopischer Besichtigung der Embryonen wurde die Allantoisflüssigkeit mittels HA-Test auf ihren Virusgehalt getestet. Die Anzahl der Hämagglutinin-positiven Eier pro Verdünnungsstufe wurde verwendet, um die Ei-infektiöse Dosis 50 für die verwendete Inokulationsdosis zu ermitteln. Basierend auf der Methode von REED und MUENCH (1938) erfolgte die Berechnung der Ei-infektiösen Dosis 50 (EID<sub>50</sub>).

<p><b>Index =</b> <math display="block">\frac{(\% \text{ positiv der Verdünnungsstufe gerade über } 50 \%) - 50 \%}{(\% \text{ positiv der Verdünnungsstufe gerade über } 50 \%) - (\% \text{ positiv der Verdünnungsstufe gerade unter } 50 \%)}</math></p> <p><b>Index + Verdünnungsstufe</b>, die gerade über 50% positiv umfasst</p>
--

(modifiziert nach FAO 2002)

**Abbildung 2: Formel zur Berechnung der EID<sub>50</sub>**

Für die durchgeführten Versuchsreihen sowohl im *in vitro*-Modell als auch mit experimentell kontaminierten Rohwürsten wurde die Angabe der infektiösen Dosis im Ei nach der höchsten positiven Verdünnungsstufe im Ei, als infektiöse Dosis (ID)  $\log_{10}$  vorgenommen.

### 3.2.5 Real time RT-PCR

Um den Virusnachweis in Rohwurstprodukten abzusichern, erfolgte ein qualitativer Erregernachweis zusätzlich mittels real time RT-PCR.

Die Homogenate der Rohwurstproben wurden dazu zentrifugiert und der Überstand für die RNA-Aufreinigung verwendet. Diese erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers Qiagen mit dem „Viral RNA mini Kit 50“. Die Primer beziehungsweise Sonde für die PCR wurden jeweils über die Biomers.net GmbH (Ulm), bezogen, die verwendeten one Step-Kits von der Firma Qiagen (Hilden).

Der PCR-Ansatz erfolgte gemäß Herstellerangaben mit einem Volumen von jeweils 25 µl. Die Temperaturprofile für das Cyclerprogramm wurden ebenfalls nach Vorgabe von Qiagen verwendet.

Die Influenza RT-PCR erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll des Friedrich Löffler Institutes (2005). Die verwendeten Primer und Sonde basieren auf einer Publikation von SPACKMAN *et al.* (2002). Es wird ein 100 bp- Fragment aus dem Matrixprotein-Gen von Influenza A-Viren amplifiziert. Es wurde das „Quantitect Probe RT- PCR Kit“ von Qiagen verwendet. Für den Stamm ECHO 1 Farouk wurden die Primer mittels des Programms „MegAlign“ der Firma DNASTar designt. Das amplifizierte Fragment aus der VP 1 Region umfasst eine Größe von 101 bp. Für die PCR wurde das „Quantitect SYBR RT-PCR Kit“ von Qiagen verwendet. Die PCR-Amplifikate wurden anschließend in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromidbehandlung mittels UV-Translumineszenz visualisiert.

Tabelle 16: Übersicht der für die RT-PCR verwendeten Primer und Sonde

<b>Influenza A</b>	Primer forward	5' - aga tga gtc ttc taa ccg agg tcg – 3'
	Primer revers	5' - tgc aaa aac atc ttc aag tct ctg – 3'
	Probe 5' Mod. 6- Fam 3' Mod. BHQ -1	5' - tca ggc ccc ctc aaa gcc ga – 3'
<b>ECHO-Virus</b>	Primer forward	5' - ctt gcc aga tca gcg tgt gt – 3'
	Primer revers	5' - gcc act cgc ctg gtt gta at – 3'

### 3.2.6 Untersuchungen

Tabelle 17: Gesamtübersicht zu den durchgeführten Versuchsreihen

Versuchsreihen		Virus			zur Versuchsreihe durchgeführte Messungen/ Untersuchungen			
		ECHO- Virus	H3N8- Virus	H5N6- Virus	pH- Wert	a <sub>w</sub> - Wert	chemische Untersuchung	mikrobiologische Untersuchung
<i>in vitro</i>	NaCl	x	x		x	x		
	MS	x	x		x			
Rohwurst	kurzgereift	x	x	x	x	x	x	x
	langgereift	x			x	x	x	x

Im Produkt Rohwurst spielen die Faktoren Natriumchlorid und Natriumnitrit sowie D/L-Milchsäure eine wichtige Rolle zur mikrobiellen Stabilisierung und Konservierung. Daher wurde zunächst der Einfluss dieser Faktoren auf die Tenazität und Inaktivierung von ECHO-Virus als auch von Influenzaviren *in vitro* untersucht. Die *in vitro*-Versuchsreihen erfolgten unter Verwendung phosphatgepufferter Kochsalzlösung, welche mit den entsprechenden Konzentrationen an Natriumchlorid, Natriumnitrit sowie einem Racemat aus gleichen Anteilen D- und L-Milchsäure supplementiert wurde (Tabelle 1818). Die Versuchsreihen wurden bei Temperaturen von 4 °C und 20 °C durchgeführt. Die Expositionszeit des ECHO-Virus mit Natriumchlorid und Natriumnitrit sowie D/L-Milchsäure betrug jeweils drei Stunden und sieben Tage. Die beiden Versuchsreihen wurden insgesamt je fünfmal durchgeführt.

Analog zu den Versuchsbedingungen der Versuchsreihe mit D/L-Milchsäure wurde der Einfluss von Salzsäure (HCl) auf ECHO-Viren untersucht. Dazu wurden die pH-Werte entsprechend der zuvor gemessenen Werte im Milchsäureversuch mit Salzsäure in PBS eingestellt und die Viren mit diesen Lösungen inkubiert. Die Versuchsreihe wurde zweimal durchgeführt.

Aufgrund des zeit- und arbeitsaufwändigen Nachweises im Brutei wurden die Versuchsreihen mit Influenzaviren reduziert. Für das Virus Typ H3N8 wurde der Einfluss von NaCl bei 4 °C und 20 °C mit Expositionszeiten von drei, sieben und zehn Tagen geprüft. Der

Einfluss von D/L-Milchsäure wurde bei 4 °C und 20 °C mit Expositionszeiten von 1 Stunde, 24 und 72 Stunden geprüft.

**Tabelle 18: Übersicht verwendeter Konzentrationen an Natriumchlorid, Natriumnitrit und D/L-Milchsäure sowie eingesetzter Virustiter für die Durchführung der *in vitro*-Versuchsreihen**

Virus	Natriumchlorid (%) in PBS	Natriumnitrit (ppm)	D/-L Milchsäure (%)	Zeit	Temp. (°C)
<b>ECHO-Virus</b> Titer $10^{8,25}$ TCID <sub>50</sub> /ml	0,8			3 h/ 7 d	4/ 20
	2,0				
	6,0				
	12,0				
	20,0				
	2,0	100			
	2,0	150			
<b>ECHO-Virus</b> Titer $10^{8,0}$ TCID <sub>50</sub> /ml	2,0	200		3 h/ 7 d	4/ 20
	0,8		0,10		
	0,8		0,15		
	0,8		0,20		
	0,8		0,30		
	0,8		0,40		
<b>Influenza-Virus H3N8</b> Titer $5 \times 10^{7,38}$ EID <sub>50</sub> /ml	0,8			3/ 7/ 10 d	4/ 20
	2,0				
	6,0				
	12,0				
<b>Influenza-Virus H3N8</b> Titer $5 \times 10^{7,38}$ EID <sub>50</sub> /ml	0,8		0,00	1/ 24 / 72 h	4/ 20
	0,8		0,10		
	0,8		0,15		
	0,8		0,20		

### 3.2.6.1 Untersuchungen *in vitro*

Die Herstellung der Natriumchloridlösungen erfolgte unter Verwendung von NaCl-freiem PBS, in dem die entsprechende Gewichtsteile an NaCl beziehungsweise NaNO<sub>2</sub> eingewogen wurden (Tabelle 18). Im Anschluss wurde der pH-Wert in den fertigen Lösungen gemessen und bei Bedarf mittels NaOH beziehungsweise HCl auf Werte im neutralen Bereich (pH 7,3 – 7,6) eingestellt. Die Lösungen wurden in festverschließbare Schraubgläschen gefüllt und autoklaviert.

Die Herstellung der D/L-Milchsäurelösungen erfolgte ebenfalls unter Verwendung von PBS, in dem die entsprechenden Gewichtsanteile an D/L-Milchsäure eingewogen wurden. Die Lösungen wurden in Schraubgläschen gefüllt und aufgrund der Hitzelabilität der D/L-Milchsäure nicht autoklaviert. Alternativ wurde eine Sterilfiltration unmittelbar vor Gebrauch durchgeführt.



Die Versuchslösungen mit Natriumchlorid und Natriumnitrit sowie mit D/L-Milchsäure wurden mit der entsprechenden Virussuspension (Virus in Zellkulturmedium) in einem Verhältnis von 1:10 in Schraubröhrchen angesetzt. Dazu wurden je 9,0 ml der Versuchslösung vorgelegt und 1,0 ml Virussuspension hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mittels pH-Elektrode in dem Ansatz gemessen. Die Ansätze wurden auf 5 ml aufgeteilt, die Röhrchen fest verschlossen, kurz gevortext beziehungsweise geschwenkt und bei 4 °C oder 20 °C Raumtemperatur gelagert.

Die Probennahme erfolgte bei ECHO-Viren nach drei Stunden und nach sieben Tagen. Dazu wurden die Röhrchen vorher aufgeschwenkt und etwas Probenflüssigkeit in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach erfolgten Titration und Titerbestimmung der Proben mittels Zellkultur (siehe 3.2.3).

Für Influenzavirus H3N8 erfolgten die Probennahmen bei den Versuchsreihen mit D/L-Milchsäure nach 1, 24 und 72 Stunden und bei den Versuchsreihen mit Natriumchlorid nach drei, sieben und zehn Tagen. Die Probenflüssigkeit wurde sterilfiltriert und das Filtrat für den Infektiositätsnachweis in embryonierte Hühnereier verimpft (siehe 3.2.4).

### **3.2.6.2 Untersuchungen in Rohwürsten**

#### **3.2.6.2.1 Herstellung experimentell kontaminierter Rohwürste**

Für die Untersuchungen mit Rohwurst wurde jeweils eine Kontrollcharge an Würsten hergestellt und im Anschluss eine Charge mit experimentell viruskontaminierten Rohwürsten.

Zunächst wurden die Rezepturbestandteile separat eingewogen, Natriumnitrit und Natriumchlorid wurden anschließend miteinander zu Pökelsalz vermischt. Das Fleisch sowie der Speck wurden nach dem Einwiegen bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Das Fleisch wurde mit einer Temperatur von ca. -4 °C in die Kutterschüssel gegeben (Abbildung 3) und bei 840 U/min für fünf Minuten gekuttert. Es folgte die Zugabe der Virussuspension (bei Herstellung der infizierten Chargen) beziehungsweise alternativ von Zellkulturmedium (bei den Kontrollchargen). Ebenso wurden GdL, Pfeffer und Na-Ascorbat während des Kutterprozesses zugegeben. Unter schrittweiser Zugabe des Rückenspecks wurde bei gleicher Geschwindigkeit kontinuierlich bis zum Erreichen eines grob zerkleinerten Grundbräts gekuttert. Danach erfolgte die Zugabe von Pökelsalz (Natriumchlorid mit Nitrit) und weiteres Kuttern bis zu einer Endkörnung des Bräts von 3-4 mm. Diese Körnung war nach circa sechs Minuten erreicht. Für die streichfähigen Würste wurde das Brät an dieser Stelle bis zur Entstehung einer streichfähigen Brätmasse weiter gekuttert (Abbildung 4).



**Abbildung 3: Befüllung des Kutters mit vorzerkleinertem Rohfleisch zu Beginn des Kutterprozesses**



**Abbildung 4: Streichfähiges Wurstbrät am Ende des Kutterprozesses**

Von der experimentell mit Virussuspension kontaminierten Brätmasse wurden Proben direkt aus der Kutterschüssel zur virologischen, mikrobiologischen und physikalischen Untersuchung (Probennahmezeitpunkt: Tag 0) mittels sterilen Bestecks gewonnen.

Anschließend wurde das Wurstabfüllgerät unter Vermeidung von Lufteinschlüssen mit dem hergestellten Brät befüllt. Es folgte das manuelle Abfüllen des Brätes in Wursthüllen (kurzgereift Kaliber 38, langgereift Kaliber 40). Um ein Absinken des  $a_w$ -Wertes zu vermeiden, erfolgte bei den kurzgereiften Rohwürsten nach der Räucherung eine Umverpackung in Vakuumbbeutel. Die Würste wurden nach Punkt 3.2.6.2.2 gelagert und gereift.

**Tabelle 19: Grundrezeptur zur Herstellung der Rohwürste**

Rezepturbestandteile	Zugabe pro 1 kg Rohmaterial	Konzentration pro 1 kg Rohmaterial
Natriumchlorid	26,0 g	2,51 %
Natriumnitrit	150 mg	145 ppm
Pfeffer	2,0 g	0,19 %
Glucono-delta-Lacton (GdL)	6,0 g	0,58 %
Natrium (L)-Ascorbat	0,5 g	0,048 %
Schweinefleisch S I, Rindfleisch R I, Rückenspeck V, Putenoberkeulenfleisch, jeweils in verschiedenen Anteilen		

Für die Untersuchungen zur Tenazität des ECHO-Virus in kurzgereiften Rohwürsten wurden insgesamt 4 kg Wurstbrät bestehend aus 2,8 kg Schweinefleisch S I und 1,2 kg Rückenspeck V hergestellt. Die experimentelle Kontamination des Brätes erfolgte mit 40 ml einer Virussuspension mit einem Titer von  $10^{8,75}$  log TCID<sub>50</sub>/ml. Daraus ergibt sich eine theoretische Kontaminationsdosis von 0,1 ml Suspension ( $10^{7,75}$  TCID<sub>50</sub>) auf 10 g Brät.

Für die Untersuchungen in langgereiften Rohwürsten wurden 4 kg Wurstbrät aus 1,4 kg Schweinefleisch, 1,4 kg Rindfleisch und 1,2 kg Schweinespeck hergestellt. Das Brät wurde mit 40 ml Virussuspension mit einem Titer von  $10^{8,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml beimpft, was einer Kontaminationsdosis von 0,1 ml Suspension ( $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub>) auf 10 g Brät entspricht.

Die Versuchsreihen mit Influenza-Viren wurden nur anhand experimentell kontaminierter, streichfähiger Rohwurst durchgeführt. Es wurden jeweils 2 kg Wurstbrät unter Verwendung von 0,7 kg Schweinefleisch, 0,7 kg Putenoberkeulenfleisch und 0,6 kg Schweinespeck hergestellt. Die experimentelle Kontamination pro Kilogramm Brät erfolgte mit 10 ml virushaltiger Allantoisflüssigkeit mit einer infektiösen Dosis von  $5 \times 10^{7,25}$  beziehungsweise  $5 \times 10^{7,38}$  EID<sub>50</sub>/ml. Die Kontaminationsdosis betrug somit 0,1 ml Suspension ( $10^{6,25}$  beziehungsweise  $10^{6,38}$  EID<sub>50</sub>) auf 10 g Brät.

Das Brät wurde nach der Herstellung unter Vakuum modellhaft in Portionen von ca. 200 g abgepackt.

### 3.2.6.2.2 Reifung und Lagerung der Rohwürste

Für die Untersuchungen mit ECHO-Virus wurden die kurzgereiften streichfähigen Rohwürste bei zwei Temperaturprofilen für 28 Tage gereift (Tabelle 20).

**Tabelle 20: Reifung und Lagerung kurzgereifter Rohwürste der Versuchsreihe mit ECHO-Virus**

Tag	Temperatur (°C)	Temperatur (°C)
0-3*	22	22
4-7	22	7
8-28	22	7

\* Räucherung

Die relative Luftfeuchtigkeit wurde über den gesamten Zeitraum auf 92 % eingestellt. Alle Würste wurden am Tag drei für 16 h bei 22 °C geräuchert und anschließend zusätzlich umhüllt, um die Abnahme des  $a_w$ -Wertes so gering wie möglich zu halten. Die langgereiften schnittfesten Rohwürste wurden bei einem Temperaturprofil für 56 Tage gereift und gelagert (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Reifung und Lagerung langgereifter Rohwürste der Versuchsreihe mit ECHO-Virus**

Tag	Temperatur (°C)	Relative Luftfeuchte (%)
0-1	23	90
2*-3	22	90
4-11	18	85
12-56	18	70

\* Räucherung

Die relative Luftfeuchte wurde mit fortschreitender Reifedauer schrittweise abgesenkt. Alle Würste wurden am Tag zwei für zehn Stunden bei 22 °C geräuchert.

Die Reifungs- und Lagerungsbedingungen für die Versuche mit Influenzaviren gehen aus Tabelle 22 hervor.

**Tabelle 22: Reifung und Lagerung von kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit Influenzavirus H3N8 und H5N6**

Virus	Tag	Temperatur (C°)
H5N6	0 - 18	22 und 7
H3N8	0 - 14	22 und 7

Das Wurstbrät wurde unter Vakuum verpackt und bei den jeweiligen Temperaturen gereift und gelagert. Es erfolgte keine Räucherung.

### 3.2.6.2.3 Probennahme/ Beprobung von Rohwurst

Tabelle 23: Probennahmetage für die virologische, mikrobiologische und physikalische Untersuchung

<b>ECHO-Virus</b> , kurzgereifte Rohwurst	0	3	7	14	21	28			
<b>ECHO-Virus</b> , langgereifte Rohwurst	0	7	14	21	28	35	42	49	56
<b>Influenzavirus H3N8, H5N6</b> , kurzgereifte Rohwurst	0	1	3	7	10	14	17*		

\* nur H5N6

An den entsprechenden Probenahmetagen wurde jeweils eine Wurst beider Temperaturprofile untersucht. Mittels steriler Schere wurde die Wursthülle aufgeschnitten und mit sterilem Besteck eine Probe Wurstbrät entnommen. Insgesamt wurden so fünf Proben pro Wurst gewonnen. Es folgte das Abwiegen der Brätproben auf zehn Gramm. Diese wurden unter Zugabe von 90 ml PBS für 60 Sekunden (bei streichfähigem Brät) beziehungsweise 120 Sekunden (bei schnittfestem Brät) im Stomacher homogenisiert. Anschließend wurde mittels Einmalpipetten eine Menge von 2 ml Probenvolumen aus dem Wurstbräthomogenat entnommen und in Eppendorfgläser überführt. Diese wurden bei 8000 rpm für vier Minuten zentrifugiert und der erhaltene Überstand der Proben per Spritzenvorsatzfilter sterilfiltriert. Es folgte die direkte Titration der Proben in PBS und Übertragung auf die Zellkultur (siehe 3.2.4).

(Die in Vorversuchen getestete Toxizität der Wurstsuspension auf die Zellen zeigte nur bei niedrigster Verdünnungsstufe von  $10^{-1}$  gering bis mittelgradige Effekte. Diese zeigten sich als abgrenzbar zu denen eines Virus verursachten cpe.)

Im Fall der mit AIV experimentell kontaminierten Wurstproben erfolgte die Entnahme der Brätproben direkt aus den unter Vakuum verschlossenen Abpackungen. Die Probeneinwaage mit PBS für die Aufbereitung mittels Stomacher erfolgte neben dem bereits aufgeführten 1:10 Verhältnis zusätzlich in den Verhältnissen von 1:5 und 1:4. Nach Zentrifugation sowie Sterilfiltration wurden die entsprechenden Probenverdünnungen in Bruteier injiziert (siehe 3.2.4).

Nach der sterilen Probenentnahme wurden im Brät des verbliebenen Wurstmaterials der pH-Wert und der  $a_w$ -Wert bestimmt. Die restlichen Brätproben wurden unter Vakuum abgepackt und bei -80 °C gelagert. Für die Durchführung der chemischen Analyse wurden die Würste nachfolgend zur Untersuchung herangezogen.

Dabei erfolgte die chemische Untersuchung aus Gründen der Laborsicherheit nur anhand der unbeimpften Würste der Kontrollchargen.

### 3.2.6.2.4 Mikrobiologische Untersuchung der Wurstproben

Die mikrobiologische Untersuchung erfolgte anhand der aufbereiteten Probenhomogenate sowohl der infizierten Würste als auch der unbeimpften Würste. Mittels Oberflächenspatelverfahren wurde die aerobe mesophile Keimzahl auf Plate count (PC)-Agar, die Zahl der Milchsäurebakterien auf Man-Rogosa-Sharpe (MRS)-Agar sowie die Zahl der *Enterobacteriaceae* auf Desoxicholat-Hydrogen-Sulfide-Lactose(DHL)-Agar. Die Bestimmung der aeroben Keimzahl und der Milchsäurebakterien erfolgte gemäß den Methoden des LFGB § 64, L 08:00-37 und L 08.00-41. Die Keimzahlbestimmungen erfolgten jeweils im Doppelansatz. Dazu wurde das Wurstbräthomogenat mit Peptonwasser zunächst in dezimalen Stufen verdünnt. Anschließend wurden je 100 µl der entsprechenden Verdünnungsstufen auf MRS-Agar und PC-Agar übertragen und ausgespatelt. Die Beimpfung des DHL-Agars erfolgte direkt mit der Verdünnungsstufe  $10^{-1}$  mit einem Volumen von 1 ml gleichmäßig verteilt auf drei Platten.

Die MRS- und PC- Agarplatten wurden für 72 Stunden bei 30 °C inkubiert, die DHL- Platten für 24 Stunden bei 37 °C. Anschließend erfolgte die Berechnung der koloniebildenden Einheiten in der Probe mit Hilfe des gewichteten arithmetischen Mittels (Abbildung 5).

$\bar{c} = \frac{\sum c}{n_1 \cdot 1 + n_2 \cdot 0,1}$	$\sum c$ - Summe der Kolonien aller ausgezählten Platten $n_1$ - Anzahl der Platten der niedrigsten auswertbaren Verdünnungsstufe $n_2$ - Anzahl der Platten der nächst höheren Verdünnungsstufe
$KZ = \bar{c} \cdot v \cdot \frac{1}{10^{-n}}$	$\bar{c}$ - gewichteter Mittelwert der gezählten Kolonien $10^{-n}$ - niedrigste auswertbare Verdünnungsstufe $v$ - Verdünnungsfaktor (10)

Abbildung 5: Formel zur Berechnung der Gesamtkeimzahl als KbE/g

### 3.2.6.2.5 Chemisch-physikalische und chemische Untersuchung der Würste

Zum Zeitpunkt der Probennahme wurde von allen beprobten Würsten der pH- und  $a_w$ -Wert bestimmt. Die Bestimmung des Gehaltes an Rohprotein, Gesamtfettgehalt, Trockenmasse, Hydroxyprolin, Nitrit und D/L-Milchsäure wurde ausschließlich bei den unbeimpften Kontrollwürsten durchgeführt. Die Bestimmungen erfolgten im Doppelansatz nach den Vorgaben des § 64 LFGB (siehe Anhang).

### 3.2.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der ermittelten Untersuchungsergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS Version 15 für Windows (SPSS GmbH Software München).

Für die statistische Auswertung der Versuchsreihen mit ECHO-Virus wurden die Messwerte „Virustiter“ logarithmiert. Es wurde anschließend eine Prüfung dieser Messwerte auf Normalverteilung innerhalb der Gruppen mittels Shapiro Wilk-Test durchgeführt. Für alle Versuchsreihen mit ECHO-Viren in den *in vitro*-Studien sowie in kurz- und langgereiften Rohwürsten konnte Normalverteilung angenommen werden.

In der deskriptiven statistischen Analyse wurden Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum, Maximum und die Konfidenzintervalle der Messwerte „Virustiter“ in den einzelnen Gruppen der verschiedenen Versuchsreihen bestimmt.

Zum Vergleich von Gruppen miteinander wurde zunächst die einfaktorielle Varianz-Analyse ANOVA (Analysis of Variance) für die abhängige Variable Virustiter als Methode zum Vergleichen von mehreren Gruppenmittelwerten mit nachgeschalteter post hoc Betrachtung durchgeführt.

Nach Prüfung auf Gleichheit der Fehlervarianzen mittels Levene-Test, wurden die post hoc-Tests mit den Verfahren nach Bonferroni oder nach Tamhane bei Varianzgleichheit beziehungsweise mit dem Verfahren nach Tukey bei Ungleichheit der Varianzen durchgeführt.

Die Prüfung von Unterschieden zwischen den Gruppen hinsichtlich der gemeinsam beobachteten Variablen „Virustiter“ erfolgte mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben. Dabei wurde bei den *in vitro*-Modellen eine Einteilung der Gruppen nach Zeit, Temperatur sowie untersuchter Bedingung vorgenommen (Erzeugung von Teil-Stichproben). Basierend auf den beobachteten arithmetischen Mittelwerten für die Größe Virustiter erfolgte der Vergleich der verschiedenen Gruppen untereinander.

Die Prüfung der linearen Regression ( $R^2$ ) der Variablen „Virustiter“ und „Zeit“ erfolgte für die Versuchsreihen mit kurz- und langgereiften Rohwürsten getrennt nach Temperatur (7 °C / 22 °C). Die Prüfung auf Korrelation (Korrelationskoeffizient  $r$ ) der Variablen „Virustiter“ und „Zeit“ erfolgte ebenfalls getrennt nach Temperatur für die Versuchsreihen mit kurz – und langgereiften Rohwürsten. Für die Berechnung der Korrelationen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet.

Aufgrund des zeit- und arbeitsaufwändigen Infektiösitätsnachweises der Influenzaviren in embryonierten Hühnereiern, wurden sowohl die *in vitro*-Versuchsreihen als auch die Versuchsreihen mit Rohwurst reduziert. Durch die notwendige Reduktion des Versuchsumfangs musste die Auswertung der Ergebnisse auf Basis geringerer Stichprobenumfänge, teilweise anhand von Einzelanalysen vorgenommen werden. Dies führt zu gewissen Einschränkungen bezüglich der Aussage eines statistischen Nachweises.

Die Auswertung der Ergebnisse basierend auf der Virustitration in embryonierten Hühnereiern, erfolgte sowohl für die *in vitro*-Versuche mit Natriumchlorid als auch für die Versuche in Rohwürsten unter Anwendung von nichtparametrischen Tests. Dazu wurden die ermittelten Werte der infektiösen Dosen („Virustiter“) ebenfalls logarithmiert.

Zunächst wurden die Ergebnisse der Rohwurstversuchsreihen im Kruskal-Wallis-Test getrennt nach Zeit hinsichtlich der im Ei erzielten „Virustiter“ für die Temperaturen von 7 °C und 22 °C miteinander verglichen. Anschließend erfolgte die Prüfung von Unterschieden zwischen den Gruppen hinsichtlich der gemeinsam beobachteten Variablen „Virustiter“ mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests. Dabei wurde für die *in vitro*-Versuche eine Einteilung der Gruppen nach Zeit, Temperatur sowie untersuchter Bedingung vorgenommen (Erzeugung von Teil-Stichproben). Basierend auf der Vergabe von Rängen für die Größe der „Virustiter“ erfolgte der Vergleich der verschiedenen Gruppen untereinander.

Die Prüfung der linearen Regression ( $R^2$ ) der Variablen „Virustiter“ und „Zeit“ erfolgte für die Versuchsreihe mit kurzgereiften Rohwürsten getrennt nach Temperatur. Ebenso erfolgte die Prüfung auf Korrelation der beiden Variablen unter Anwendung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman.

In allen durchgeführten statistischen Tests wird ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  angenommen.



## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Virusnachweis mittels BGM-Zellkultur**

Die Zellkulturen wurden bei 40-facher mikroskopischer Vergrößerung digital aufgenommen. Die Darstellung der Zellkultur sowie des durch ECHO-Virus hervorgerufenen cpe befinden sich im Anhang. Die in Vorversuchen geprüfte Zytotoxizität der Wurstprobenhomogenate in der Zellkultur konnte geringgradig in der niedrigsten Verdünnungsstufe beobachtet werden mit einer deutlichen Abgrenzung zum Virus-cpe.

### **4.2 Virusnachweis im Brutei**

Die exemplarische Darstellung von makroskopisch-pathologischen Befunden der Hühnerembryonen befindet sich im Anhang. Nach zunächst makroskopischer Beurteilung wurden die Embryonen in Verbindung mit den Ergebnissen des HA-Tests als positiv beziehungsweise negativ gewertet.

### **4.3 *In vitro*-Versuchsreihen**

#### **4.3.1 Einfluss von Natriumchlorid und Natriumnitrit auf ECHO-Virus**

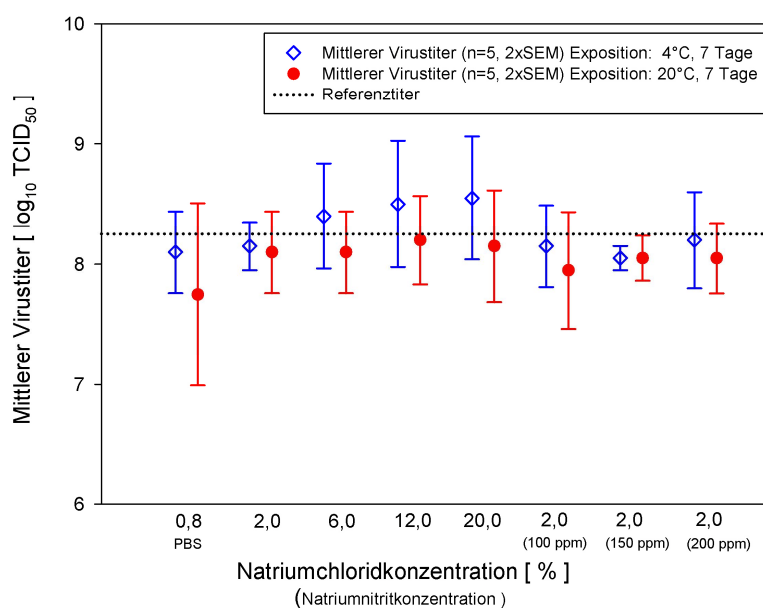
Für die Untersuchung des Einflusses von Natriumchlorid und Natriumnitrit auf die Tenazität von ECHO-Viren wurde eine Virussuspension mit einem Titer von  $10^{8,25}$  TCID<sub>50</sub>/ml eingesetzt. Unter den geprüften Versuchsbedingungen waren ECHO-Viren mit nur geringen Abweichungen im Virustiter über die gesamte Versuchsreihe nachweisbar. (Die ermittelten Virustiter sind im Anhang aufgeführt).

Tabelle 24: Versuchsgruppen in Studien zum Einfluss von Natriumchlorid und Natriumnitrit auf ECHO-Virus

Gruppe	NaCl (%) / NaNO <sub>2</sub> (ppm)	Zeit	Temperatur (°C)
1 (PBS)	0,8	3 h / 7 d	4 / 20
2	2,0		
3	6,0		
4	12,0		
5	20,0		
6	2,0 / 100		
7	2,0 / 150		
8	2,0 / 200		

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die acht Versuchsgruppen hinsichtlich der Variable „Virustiter“ mittels einfaktorieller Varianzanalyse miteinander verglichen. Dazu erfolgte eine Einteilung der Gruppen nach Temperatur und Zeit. In den angeschlossenen *post hoc*-Betrachtungen zeigten sich nach dem Verfahren von Bonferroni keine signifikanten Unterschiede im Virustiter. Um den Einfluss „Temperatur“ zu prüfen, wurden die Gruppen getrennt nach Zeit für die beiden Versuchstemperaturen im t-Test miteinander verglichen. Im Vergleich der Gruppen (Expositionstemperatur 4 °C und 20 °C) zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Höhe des Virustiters.

Zur Prüfung des Einflusses „Zeit“ wurden die Gruppen anschließend getrennt nach Temperatur für die beiden Versuchzeiten drei Stunden und sieben Tage im t-Test miteinander verglichen. Weder bei 4 °C noch bei 20 °C ließen sich signifikante Unterschiede im Virustiter beobachten.



**Abbildung 6: Mittlere ECHO-Virustiter nach 7 Tagen in Abhängigkeit von Natriumchlorid-/ Natriumnitritkonzentration und Temperatur**

Somit ließen sich in den durchgeführten Versuchsreihen weder ein Einfluss der geprüften Salzkonzentrationen, noch ein Einfluss der Versuchstemperatur oder der geprüften Expositionszeiten auf eine Inaktivierung von ECHO-Viren demonstrieren. Auch konnte durch die Zugabe von Natriumnitrit kein zusätzlicher Effekt beobachtet werden. Unter den geprüften Bedingungen zeigten ECHO-Viren eine hohe Stabilität. Abweichungen in der Höhe des Virustiters waren unter statistischer Betrachtung ohne Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 25: pH- und  $a_w$ -Werte der Natriumchlorid-Versuchsreihe mit ECHO-Virus**

Gruppe	NaCl (%) / NaNO <sub>2</sub> (ppm)	$a_w$ -Wert	pH-Wert
1	0,8	0,992 - 0,998	7,36 – 7,69
2	2,0	0,987 - 0,992	7,34 – 7,50
3	6,0	0,964 - 0,986	7,36 – 7,49
4	12,0	0,924 - 0,926	7,32 – 7,50
5	20,0	0,841 - 0,843	7,24 – 7,49
6	2,0 / 100	0,986 - 0,991	7,31 – 7,55
7	2,0 / 150	0,986 - 0,991	7,31 – 7,63
8	2,0 / 200	0,985 - 0,992	7,29 – 7,43

(Spanne der Werte aus 5 Versuchsdurchführungen)

#### 4.3.2 Einfluss von D/L-Milchsäure auf ECHO-Virus

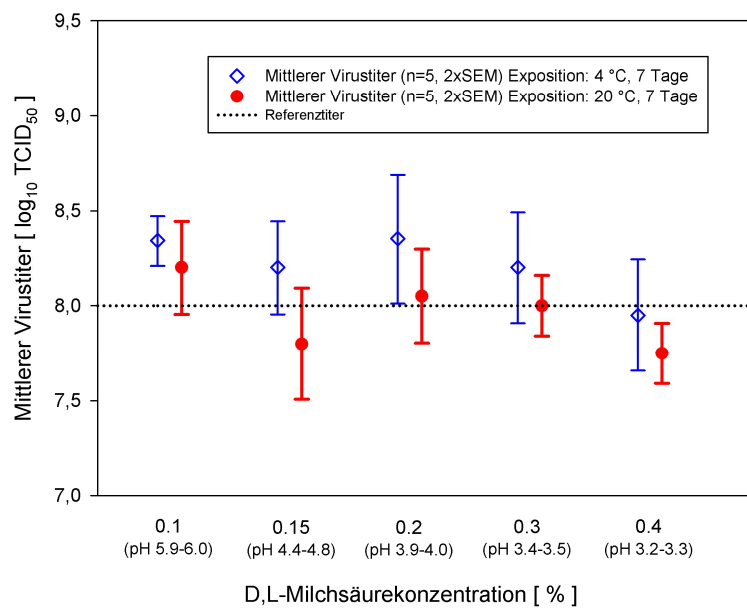
Für die Untersuchung des Einflusses von D/L-Milchsäure auf die Tenazität von ECHO-Viren wurde eine Virussuspension mit einem Titer von  $10^{8,00}$  TCID<sub>50</sub>/ml eingesetzt. Die Viren zeichneten sich über den gesamte Versuchsreihe durch hohe Stabilität bezüglich der nachweisbaren Virustiter aus. (Die ermittelten Virustiter sind im Anhang dargestellt.)

**Tabelle 26: Versuchsgruppen in Versuchsreihen zum Einfluss von D/L-Milchsäure auf ECHO-Virus**

Gruppen	D/L- MS (%) in PBS	Zeit	Temperatur (°C)
1	0,10	3 h / 7 d	4 / 20
2	0,15		
3	0,20		
4	0,30		
5	0,40		
6	0,00		

Die Versuchsgruppen 1 – 6 wurden hinsichtlich der Variable „Virustiter“ mittels einfaktorieller Varianzanalyse miteinander verglichen. Dazu erfolgte analog zu den Betrachtungen der Versuchsreihen mit NaCl und NaNO<sub>2</sub> eine Einteilung der Gruppen nach Temperatur und Zeit. Bei dieser vergleichenden Betrachtung der Gruppen zeigten sich im Verfahren nach Tamhane beziehungsweise Bonferroni keine signifikanten Unterschiede im Virustiter ( $p \leq 0,05$ ).

Um den Einfluss „Temperatur“ zu prüfen, wurden die Gruppen im t-Test getrennt nach Zeit für die beiden Versuchstemperaturen miteinander verglichen. Dabei waren keine signifikanten Unterschiede in Merkmal „Virustiter“ zu beobachten. Zur Prüfung des Einflusses der Variable „Zeit“ wurden die Gruppen getrennt nach Temperatur für die beiden Versuchszeiten miteinander verglichen. Im t-Test zeigten sich bei 4 °C signifikante Unterschiede bei den Gruppen zwei und fünf zwischen den Expositionszeiten von drei Stunden und sieben Tagen. Bei Gruppe zwei lag der beobachtete Unterschied allerdings mit  $p = 0,049$  nah an der Grenze des angenommenen Signifikanzniveaus von 0,05. Bei Gruppe fünf zeichnete sich der Unterschied mit einem Wert von  $p = 0,035$  deutlicher als signifikant ab. Bei 20 °C war ebenfalls ein signifikanter Unterschied im Virustiter bei Gruppe fünf (sieben Tage) zu beobachten ( $p = 0,025$ ).



**Abbildung 7: Mittlerer ECHO-Virustiter nach 7 Tagen in Abhängigkeit der Milchsäurekonzentration und Temperatur**

ECHO-Viren zeigten auch in der Versuchsreihe mit D/L-Milchsäure eine hohe Stabilität. Ein Einfluss der Temperatur auf die Höhe des Virustiters konnte statistisch nicht belegt werden. Ein Einfluss in Abhängigkeit von Zeit und Milchsäurekonzentration konnte für die Versuchsgruppe fünf (0,4 % MS) für beide Versuchstemperaturen ermittelt werden. Sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C zeigte sich dabei eine signifikante Abnahme des Virustiters in Abhängigkeit zur Expositionszeit ( $p \leq 0,05$ ).

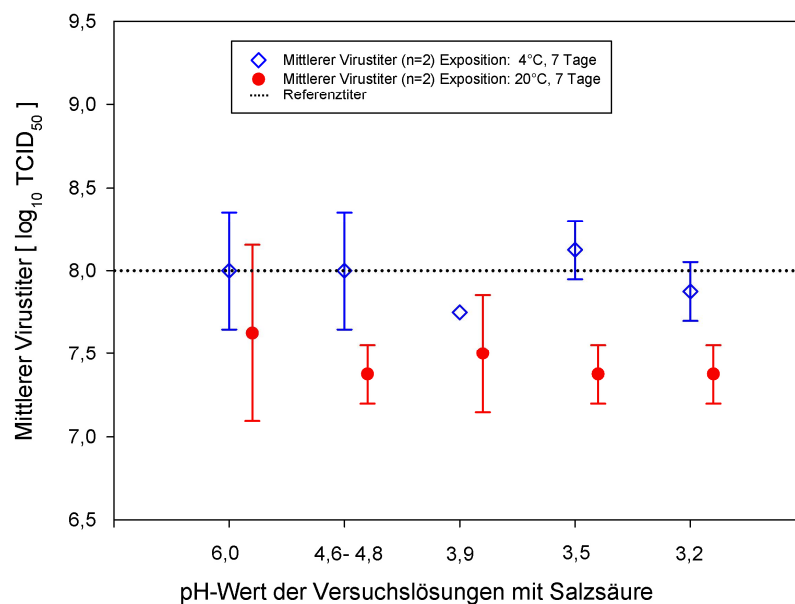
#### 4.3.3 Vergleich der Versuchsreihen zum Einfluss von D/L- Milchsäure und Salzsäure auf ECHO-Virus

Für die Versuchsreihe mit Salzsäure wurde ebenso wie bei den Versuchsreihen mit D/L-Milchsäure eine Virussuspension mit einem Titer von  $10^{8,00}$  TCID<sub>50</sub>/ml eingesetzt. Ausgehend von den gemessenen pH-Werten im Milchsäureversuch wurden entsprechende pH-Werte mit Salzsäure in PBS eingestellt. Der Versuch erfolgte zu gleichen Prüfbedingungen entsprechend der Milchsäureversuchsreihe (siehe 3.2.6.1).

**Tabelle 27: pH-Werte der Milchsäure- und Salzsäurelösungen der Versuchsreihen mit ECHO-Virus**

D/L-MS (%) in PBS	pH-Werte / Versuchsreihe MS	pH-Werte / Versuchsreihe HCl
0,10	5,85 – 6,02	6,00
0,15	4,39 – 4,76	4,60 – 4,80
0,20	3,90 – 3,95	3,90
0,30	3,44 – 3,49	3,50
0,40	3,22 – 3,26	3,20

(Spanne der Werte aus 5 (MS) bzw. 2 (HCl) Versuchsreihen)



**Abbildung 8: Mittlere ECHO-Virustiter nach 7 Tagen in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur**

Die Versuchsreihe mit Salzsäure wurde zweimal durchgeführt. Das ECHO-Virus zeigte auch hier eine hohe Stabilität.

Für den Vergleich der Versuchsreihen mit D/L-Milchsäure und Salzsäure erfolgte die Betrachtung der entsprechenden Gruppen (1- 6) hinsichtlich des gemeinsam beobachteten Merkmals „Virustiter“ getrennt nach Temperatur und Zeit. Beim Vergleich der jeweiligen Gruppen beider Versuchsreihen miteinander traten im t-Test signifikante Unterschiede im Virustiter innerhalb der Gruppen drei (3 h, 4 °C,  $p = 0,044$ ) und vier (7 d, 20 °C,  $p = 0,008$ ) auf.

In der Gesamtbetrachtung ergaben sich damit zwei Unterschiede von signifikanter Bedeutung im Vergleich der Milchsäuregruppen zu den entsprechenden Salzsäuregruppen.

Diese Unterschiede traten unabhängig von Gruppe, Zeit und Temperatur in Erscheinung, auch repräsentieren die jeweiligen Gruppen keine Extreme in den Versuchsbedingungen.

#### 4.3.4 Versuchsreihen mit Influenzaviren

Aufgrund des arbeitsaufwändigen Virusnachweises im Brutei basiert die Auswertung der Ergebnisse auf geringeren Stichprobenumfängen, teilweise auf Einzelanalysen. Dies führt zu gewissen Einschränkungen bezüglich der statistischen Auswertbarkeit. Trotz der Annahme eines Signifikanzniveaus von  $\leq 0,05$  ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass Ereignisse als signifikant eingestuft werden, welche bei Betrachtungen eines Modells mit größerem Stichprobenumfang möglicherweise nicht signifikant wären.

Daher sind die hier aufgeführten Signifikanzen nicht als endgültiger statistischer Nachweis zu betrachten.

##### 4.3.4.1 Einfluss von Natriumchlorid auf das Geflügelinfluenzavirus H3N8

Der Einfluss von Natriumchlorid auf das H3N8-Virus wurde unter folgenden Versuchsbedingungen bei Temperaturen von 4 °C und 20 °C untersucht:

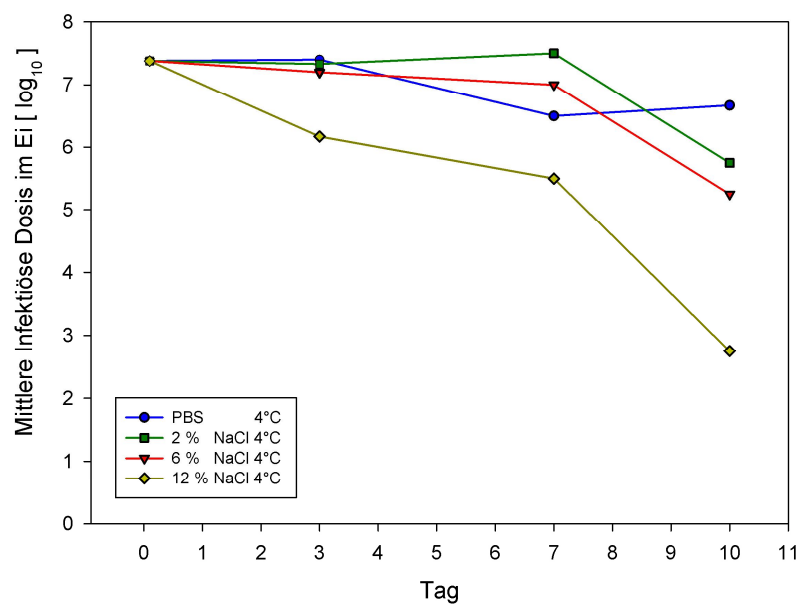
**Tabelle 28: Versuchsgruppen in Studien zum Einfluss von Natriumchlorid auf Influenzavirus H3N8**

Gruppe	NaCl (%)	pH-Werte	Zeit (d)	Temperatur (°C)
1	0,00	7,29 – 7,55	<b>3 / 7 / 10</b>	<b>4 / 20</b>
2	2,00	7,32 – 7,65		
3	6,00	7,51 – 7,68		
4	12,00	7,48 – 7,85		

In der mitgeführten PBS-Kontrolle zeigten die Viren eine über zehn Tage erhaltene Infektiösität, bei 4 °C mit konstanter infektiöser Dosis (ID), bei 20 °C mit einer Reduktion der mittleren infektiösen Dosis an Tag zehn. Diese Reduktion zeichnete sich als signifikant gegenüber Tag drei aus ( $p = 0,018$ ). Bei Inkubation mit 2 % NaCl zeigte sich nach zehn Tagen bei beiden Temperaturen ein Abfall der mittleren ID. Hier zeichnete sich der beobachtete Unterschied nur für 4 °C als signifikant aus ( $p = 0,05$ ). Bei 6 % NaCl war ab Tag drei bei 20 °C ein stetiger Abfall der mittleren ID bis Tag zehn zu beobachten. An Tag zehn waren infektiöse Viren nur noch in der niedrigsten Verdünnungsstufe ( $10^{-1}$ ) nachzuweisen. Die mittlere ID unterschied sich an Tag zehn bei dieser Salzkonzentration für beide Temperaturen signifikant zu Tag drei (mit  $p = 0,05$  für 4 °C und  $p = 0,01$  für 20 °C). Bei 12 %

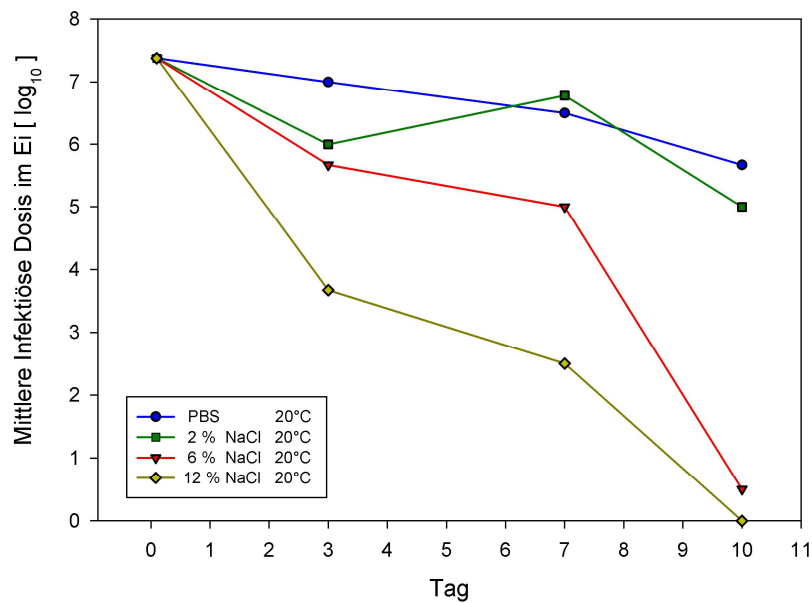
NaCl konnte nach drei Tagen bei beiden Expositionstemperaturen ein Infektiösitätsverlust der Viren beobachtet werden. Nach zehn Tagen Inkubationszeit war bei 20 °C kein infektiöses Virus mehr nachzuweisen (signifikanter Unterschied von Tag drei zu zehn mit  $p=0,05$ ). Bei 4 °C war ebenfalls ein deutlicher Infektiösitätsverlust bis Tag zehn zu verzeichnen. Der Unterschied der mittleren ID von Tag drei gegenüber Tag zehn war mit  $p = 0,05$  statistisch signifikant.

Der Abfall der mittleren ID lies sich bei 20 °C stets deutlicher beobachten als bei 4 °C. Im Vergleich der Temperaturen zeichnete sich der Unterschied der mittleren ID an Tag drei bei den Natriumchloridkonzentrationen von 2 %, 6 % und 12 % als statistisch signifikant aus (mit  $p = 0,01$ ,  $p = 0,02$  und  $p = 0,04$ ). An Tag zehn zeigten sich signifikante Unterschiede der mittleren ID bei den Konzentrationen 6 % und 12 % Natriumchlorid ( $p = 0,029$ ) im Temperaturvergleich.



**Abbildung 9: Einfluss verschiedener Natriumchloridkonzentrationen auf des Influenzavirus H3N8, bei einer Expositionstemperatur von 4 °C**





**Abbildung 10: Einfluss verschiedener Natriumchloridkonzentrationen auf das Influenzavirus H3N8, bei einer Expositionstemperatur von 20 °C**

In den Versuchsreihen mit Natriumchlorid konnte ein Einfluss von Temperatur, Zeit und Salzkonzentration auf die Inaktivierbarkeit des H3N8-Virus beobachtet werden. Die mittels Mann Whitney-Test ermittelten Signifikanzen sind im Einzelnen im Anhang aufgeführt.

#### 4.3.4.2 Einfluss von D/L-Milchsäure auf das Geflügelinfluenzavirus H3N8

Die Milchsäureversuchsreihe erfolgte mit dem H3N8-Virus unter den in Tabelle 29 dargestellten Versuchsbedingungen.

**Tabelle 29: Versuchsgruppen in Studien zum Einfluss von D/L- Milchsäureversuchsreihe auf Influenzavirus H3N8**

Gruppe	D/L-MS (%)	pH-Werte	Zeit (h)	Temperatur (°C)
1	0,00	7,39 – 7,46	<b>1 / 24 / 72</b>	<b>4 / 20</b>
2	0,10	5,80 – 5,99		
3	0,15	4,38 – 4,70		
4	0,20	3,80 – 3,91		

In Abhängigkeit von Inkubationszeit und Milchsäurekonzentration wurden folgende Ergebnisse beobachtet.

Tabelle 30: Nachweisbarkeit von infektiösem Influenzavirus im Brutei

D/L- MS (%) in PBS	1 h (n=3)		24 h (n=2)		72 h (n=1)	
	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C	4 °C	20 °C
0,00	+	+	+	+	+	+
0,10	+	+	+	+	+	+
0,15	+	+	+	+	-	-
0,20	-	-	-	-	-	-

Virusnachweis im Ei: **ja +/ nein -**

n – Anzahl der Durchführungen (Doppelansatz)

Nach einstündiger Inkubation mit 0,2 %iger Milchsäure war unabhängig von der Temperatur kein infektiöses Virus im Brutei mehr nachzuweisen. Die gleiche Beobachtung wurde nach 72-stündiger Inkubation mit 0,15 %iger Milchsäure gemacht. Bei Inkubation mit 0,1 %iger Milchsäure waren dagegen infektiöse Viren über den gesamten Versuchszeitraum nachweisbar.

#### 4.4 Versuchsreihen mit Rohwürsten

##### 4.4.1 Hergestellte Produkte

Die Herstellung aller Rohwürste in den Versuchsreihen erfolgte mit einer Menge von 2,5 % Natriumchlorid in der Rezeptur. Die zu Reifebeginn ermittelten Gehalte betrugen in den kurzgereiften Rohwürsten zwischen 2,3 und 2,8 %, in den langgereiften Würsten der ECHO-Virus Versuchsreihe 1,9 %. Mit zunehmender Reifedauer und damit verbundener Abtrocknung stieg im Zuge der Trockensubstanzzunahme der Natriumchloridgehalt an. Bei den langgereiften Rohwürsten wurde ein Gehalt von 4,4 % an Tag 56 ermittelt. Die Kochsalzgehalte entsprechen damit produkttypischen Werten.

Nitrit wurde mit einer Menge von 145 ppm pro kg Brät eingesetzt. Die an Tag null beziehungsweise eins in den Rohwürsten wieder gefundenen Werte lagen zwischen 15 und 104 ppm. Nach einer Woche zeigt sich in allen Rohwürsten eine Abnahme des Nitritgehaltes. An Tag 14 war kein Nitrit mehr nachweisbar, was auf einen abgeschlossenen Umrötungsprozess hinweist.

In den hergestellten kurzgereiften Rohwürsten wurde ein charakteristisch schneller pH-Wertabfall in den ersten sieben Tagen beobachtet. Der Abnahme erfolgte bei den 22 °C gelagerten Produkten schneller als bei der 7 °C -Lagerung. Diese Beobachtung lässt sich in einer erhöhten Stoffwechselaktivität der MSB bei 22 °C und der damit verbundenen Milchsäureproduktion erklären.

Bei der Versuchsreihe mit ECHO-Viren in langgereiften Würsten stieg der pH-Wert nach anfänglichem Absinken auf 5,1 allmählich bis Tag 56 wieder an. Dies entspricht einem produkttypischen Verlauf. Mit fortschreitender Reifedauer nimmt die hohe Anzahl an MSB langsam ab und damit auch die Säureproduktion.

Die Messung der  $a_w$ -Werte in den hergestellten Rohwürsten ergab produkttypische Werte. In den kurzgereiften Würsten zeigte sich ein weitgehend konstanter  $a_w$ -Wert. In den langgereiften Produkten konnte dagegen eine charakteristische Abtrocknung während der Reifung beobachtet werden.

In Rohwürsten kommt neben D-Milchsäure als Hauptmetabolit verschiedener Laktobazillen auch L-Milchsäure (Fleischmilchsäure) vor. Der Gehalt an D-Milchsäure steigt im Verlauf der Rohwurstreifung bedingt durch die Stoffwechselaktivität der MSB. Damit spiegelt er die mikrobiologische Reifung in Rohwurstprodukten wieder.

In den kurzgereiften Rohwürsten war in der Versuchsreihe mit ECHO-Virus bis Tag 28 ein charakteristischer Anstieg des D-Milchsäuregehaltes zu beobachten. In den langgereiften Produkten zeigte sich typischerweise ein Anstieg der D-Milchsäuregehalte mit zunehmender Reifedauer. Der bereits an Tag null gemessene Gehalt an L-Milchsäure ist auf physiologisch im Muskelfleisch enthaltenes Laktat zurückzuführen.

In den kurzgereiften Produkten der Versuchsreihe mit Influenzavirus H3N8 konnte nach 14 Tagen bei 7 °C keine D-Milchsäure gemessen werden – gleichzeitig wurde ein nur geringer Anstieg in der Anzahl der MSB und der GKZ ermittelt. Bei den 22 °C gelagerten Rohwürsten wurden hingegen übliche Keimzahlen und ein Anstieg im D-Milchsäuregehalt beobachtet.

In den kurzgereiften Rohwürsten mit Influenzavirus H5N6 wurden bei beiden Temperaturen übliche Keimzahlen beobachtet, jedoch kaum eine D-Milchsäurebildung. Die gemessenen Gehalte an L-Milchsäure waren deutlich höher.



Abbildung 11: Langgereifte Rohwürste in der Reifekammer

#### 4.4.2 Tenazität von ECHO-Virus in kurzgereiften Rohwürsten

Die Kontamination des Brätes erfolgte auf 1 kg mit 10 ml Virussuspension mit einem Titer von  $10^{8,75}$  log TCID<sub>50</sub>/ml. Daraus ergibt sich eine Kontaminationsdosis von  $10^{7,75}$  TCID<sub>50</sub> pro zehn g Brät. Eine Wiederfindungsrate von 2 % kann in den entnommenen Brätproben an Tag null angenommen werden.

Tabelle 31: Mittlere Virustiter in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit ECHO-Virus

Tag (Gruppe)	TCID <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> /ml) x = Mittelwert aus n=5				Standard- abweichung	
0	22 °C	6,05 <sup>1</sup>			0,497	
3		5,55			0,274	
7	22 °C	5,30*	7 °C	5,40*	0,274	
						0,137
14	22 °C	5,45*	7 °C	5,80	0,370	
						0,112
21	22 °C	4,65*	7 °C	5,50	0,285	
						0,354
28	22 °C	4,00*	7 °C	5,00*	0,306	
						0,000

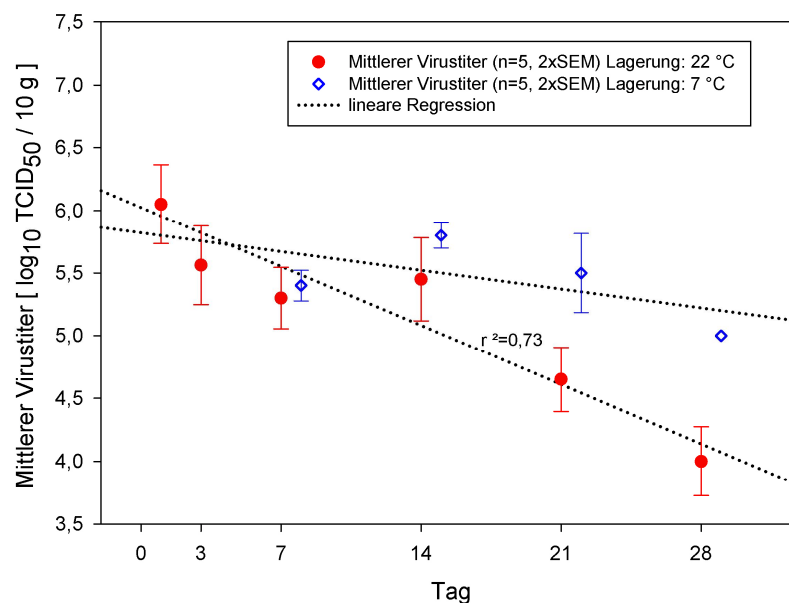
<sup>1</sup> n= 10, \* statistisch signifikanter Unterschied zu Tag 0

Die *post hoc*-Betrachtung erfolgte mit dem Verfahren nach Tukey. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Ausgangstiter (Tag 0) nach drei Tagen keine signifikante Titerreduktion.

Ab Tag sieben unterschieden sich jedoch die Virustiter aller Gruppen bei 22 °C signifikant zur Ausgangsgruppe. Bei 7 °C hingegen trat kein kontinuierlich signifikanter Unterschied auf.

Es unterschieden sich hier die Gruppen sieben und 28 signifikant zu Gruppe null. Um den Einfluss „Temperatur“ zu prüfen, erfolgte die vergleichende Betrachtung der Gruppen ab Tag sieben, da die kurzgereiften Würste bis zum Tag drei bei einheitlicher Temperatur gelagert wurden. Während sich im t-Test bei den Gruppen an Tag sieben und Tag 14 kein Unterschied im Virustiter zeigte, so ließ sich an Tag 21 und 28 ein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Temperaturen 7 °C und 22 °C feststellen. Bei 22 °C konnte eine insgesamt stärkere Reduktion des Virustiters beobachtet werden.

Die Prüfung eines linearen Zusammenhanges der Variablen Virustiter und Zeit (Tag) erfolgte getrennt nach Temperatur. Für 7 °C lag der berechnete Wert der Testgröße  $R^2$  bei 0,349. Die Anpassung an das lineare Modell ist demnach eher gering. Eine höhere Anpassung an das Modell konnte für die Virustiter bei einer Expositionstemperatur von 22 °C festgestellt werden ( $R^2=0,734$ ). Hier zeigte sich ein linearer Zusammenhang von Virustiter und Zeit deutlicher.



**Abbildung 12: Verlauf der ECHO-Virustiter in kurzgereiften Rohwürsten in Abhängigkeit von Reife- und Lagerungstemperatur**

Die Prüfung der Korrelation von Virustiter und Zeit erfolgte ebenfalls getrennt nach Temperatur. Bei 7 °C ergab sich mit Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson von -0,589 ein mittelgroßer linearer Zusammenhang. Bei 22 °C dagegen zeigte sich ein hoher linearer Zusammenhang zwischen Virustiter und Zeit mit einem Korrelationskoeffizienten von -0,857. Der Virustiter war für beide Betrachtungen negativ mit der Zeit korreliert. Die Korrelation war auf dem Niveau von 0,01 (2- seitig) signifikant.

#### 4.4.3 Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste in Versuchsreihen mit ECHO-Virus

Die chemische Untersuchung der hergestellten Rohwürste erfolgte anhand der unbeimpften Kontrollchargen, welche unter analogen Bedingungen hergestellt wurden.

**Tabelle 32 : Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen in Versuchsreihen mit ECHO-Virus**

Tag	Wasser (%)	Fett (%)	Rohprotein (%)	BEFFE (%)	BEFFE i.FE (%)
0	55,8	23,3	16,4	15,4	94,2
21	43,7	27,9	21,8	20,7	94,9

Angabe des arithmetischen Mittels jeweils aus Doppelbestimmung

BEFFE: Bindegewebsweißfreies Fleischeiweiß

BEFFE i. FE: Bindegewebsweißfreies Fleischeiweiß im Fleischeiweiß

Hinsichtlich ihrer Zusammensetzung entsprachen die kurzgereiften Rohwürste einer handelsüblichen Ware. Die Zunahme des Fett- und Proteingehaltes ist durch den Wasserverlust und die damit verbundenen Zunahme des Trockensubstanzgehaltes zu erklären.

**Tabelle 33 : Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihe mit ECHO-Virus, Reifung und Lagerung bei 7 °C**

Tag	NaCl (g/100g)	Nitrit (mg/kg)	D-MS (g/100g)	L- MS (g/100g)
0	2,8	103	0,00	0,00
3	-	15	-	-
14	-	n.n.	0,17	0,01
21	3,4	-	-	-
28	-	-	0,30	0,01

Angabe des arithmetischen Mittels jeweils aus Doppelbestimmung

n.n.: nicht nachweisbar, - nicht durchgeführt

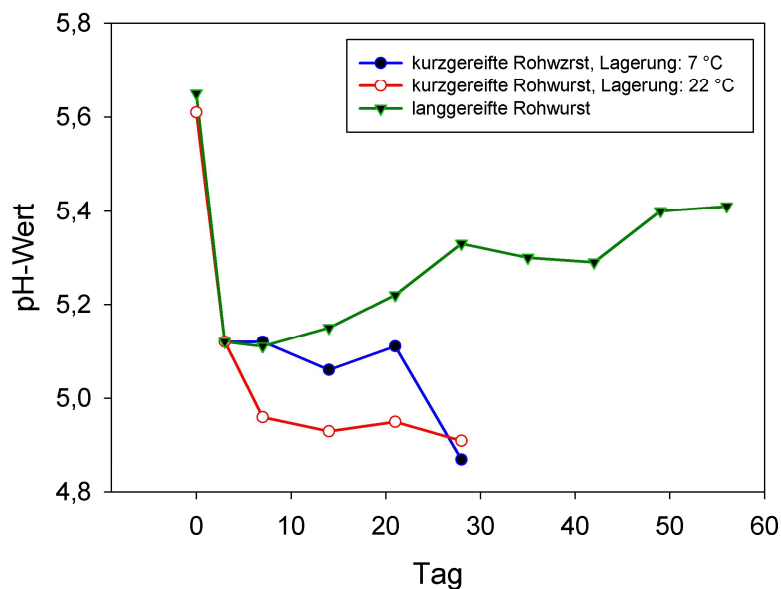
**Tabelle 34: Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihe mit ECHO-Virus, Reifung und Lagerung bei 22 °C**

Tag	NaCl (g/100g)	Nitrit (mg/kg)	D-MS (g/100g)	L- MS (g/100g)
0	2,8	104	0,00	0,01
3	-	15	-	-
14	-	n.n.	0,36	0,01
21	3,4	-	-	-
28	-	-	0,40	0,01

Angabe des arithmetischen Mittels jeweils aus Doppelbestimmung  
n.n.: nicht nachweisbar, - nicht durchgeführt

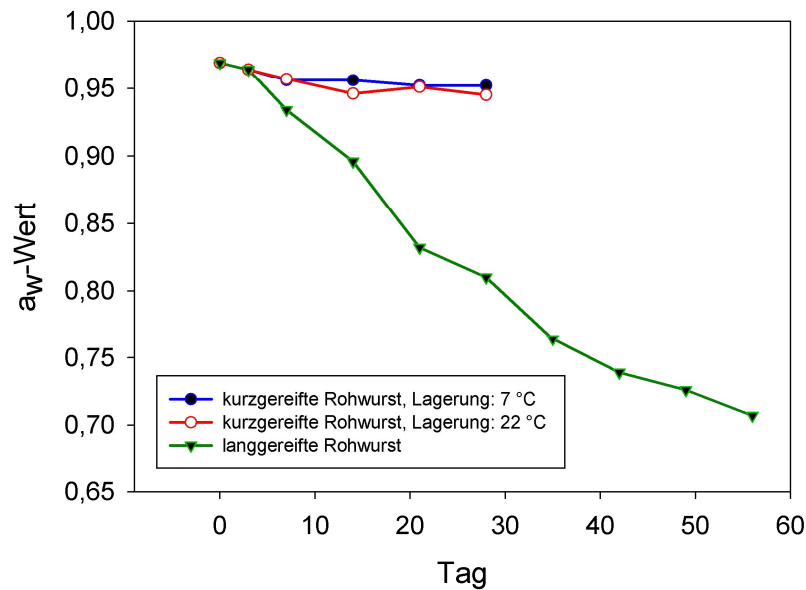
Die Ergebnisse der chemischen Analyse zeigten produkttypische Werte. Bei den Würsten beider Temperaturprofile zeigte sich im Zusammenhang mit dem Umrötungsprozess ein Abbau von Nitrit im Verlauf der Zeit. Der Natriumchloridgehalt stieg dagegen durch Wasserverlust und relative Trockensubstanzzunahme an. Ebenso stieg der Gehalt an D-Milchsäure.

In den folgenden Abbildungen 13 bis 15 sind die Verläufe von pH-Wert,  $a_w$ -Wert und der ermittelten Keimzahlen für die kurz und langgereifte Rohwürste in Versuchsreihen mit ECHO-Viren dargestellt.



**Abbildung 13: Verlauf des pH-Werts in kurz- und langgereiften Würsten in Versuchsreihen mit ECHO-Virus in Abhängigkeit von Lagerungs- und Reifetemperatur**

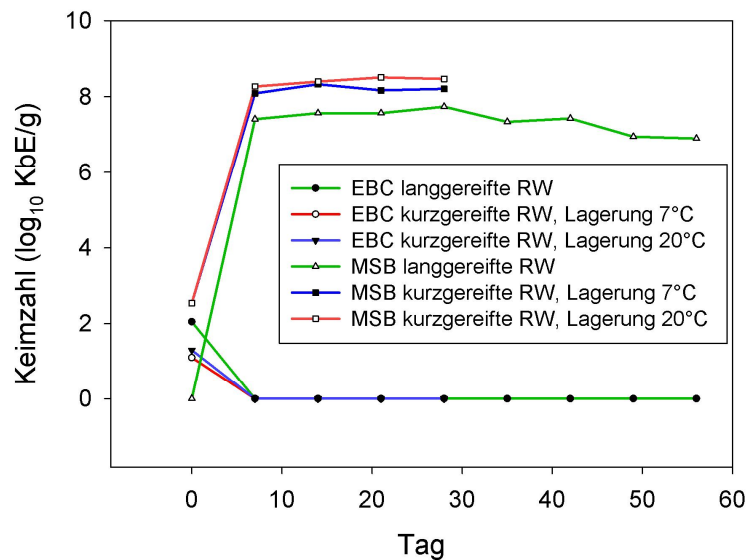
Bei den kurzgereiften Rohwürsten ließ sich ein charakteristischer Abfall des pH-Wertes erkennen. Bei 22 °C erfolgt die Reduktion des pH-Wertes schneller. In den langgereiften Rohwürsten zeigte sich ein rascher Abfall des pH-Wertes nach sieben Tagen. Bis zum Ende der Untersuchungsreihe (Tag 56) war ein allmählicher Wiederanstieg des pH-Wertes festzustellen.



**Abbildung 14: Verlauf der  $a_w$ -Werte in kurz- und langgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit ECHO-Virus in Abhängigkeit von Lagerungs- und Reifungstemperatur**

Die Reduktion des  $a_w$ -Wertes zeigte in Abhängigkeit zur hergestellten Rohwurstsorte eine unterschiedliche produkttypische Dynamik. Bei den kurzgereiften Rohwürsten trat durch die Umverpackung nach der Räucherung nur ein geringer Wasserverlust auf, was folglich nur geringe Änderungen des  $a_w$ -Wertes bedingte. Im Vergleich dazu, erfolgte bei langgereiften Rohwürsten bis Tag 56 eine deutliche Reduktion des  $a_w$ -Wertes auf 0,70.





**Abbildung 15: Keimzahlverlauf in kurz- und langgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit ECHO-Virus in Abhängigkeit von Lagerungs- und Reifungstemperatur**

Die Keimzahlverläufe verhielten sich ebenfalls produkttypisch. Die Anzahl der *Enterobacteriaceae* sank deutlich unter  $\log 2,0$  KbE/g ab, während sich indes die Anzahl der Milchsäurebildner rasch erhöhte und die Keimflora dominierte. Bei der langgereiften Rohwurst ließ sich mit fortschreitender Reifedauer ein leichtes Absinken der Anzahl an Milchsäurebildnern erkennen.

#### 4.4.4 Tenazität von ECHO-Virus in langgereiften Rohwürsten

Bei der Herstellung der langgereiften Rohwürste wurde 1 kg Brät mit 10 ml einer Virussuspension mit einem Titer von  $10^{8,5}$  TCID<sub>50</sub>/ml artifiziell kontaminiert. Das entspricht einer Kontaminationsdosis von  $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub> auf zehn Gramm. Somit kann eine Wiederfindungsrate von 3,8 % in den entnommenen Brätproben an Tag null angenommen werden.

Tabelle 35: Probentage und mittlere Virustiter in langgereiften Rohwürsten in Versuchsreihen mit ECHO-Virus

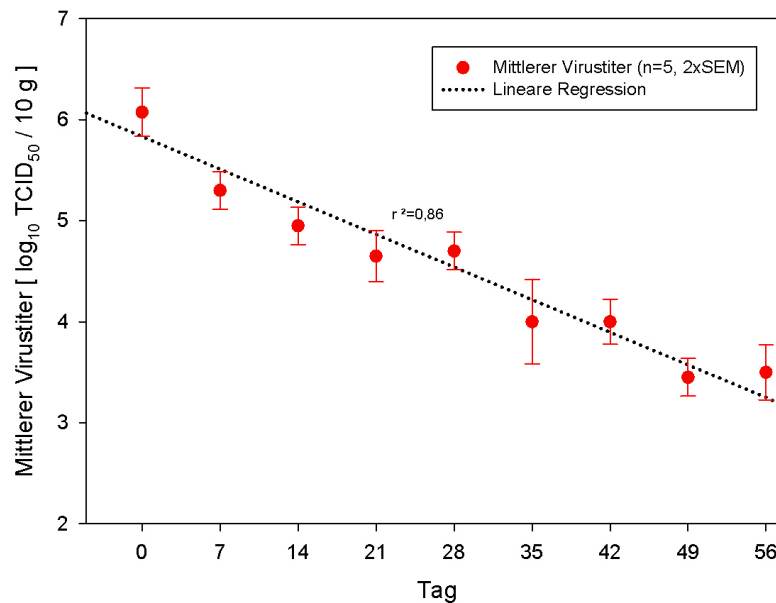
Tag (Gruppe)	TCID <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> /ml) x = Mittelwert aus n=5	Standard- abweichung
0	6,08 <sup>1</sup>	0,374
7	5,30*	0,209
14	4,95*	0,209
21	4,65*	0,285
28	4,70*	0,209
35	4,00*	0,467
42	4,00*	0,250
49	3,54*	0,209
56	3,50*	0,306

<sup>1</sup> n= 10, \* statistisch signifikanter Unterschied im Virustiter zu Tag 0

In der *post hoc*-Betrachtung mit dem Verfahren nach Tukey wurde im Vergleich zu Gruppe null bei Gruppe sieben bis 56 ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Variable „Virustiter“ deutlich. Ab Tag sieben unterschieden sich somit die Virustiter aller Gruppen signifikant vom Anfangstiter. (Die einzelnen Signifikanzwerte sind im Anhang dargestellt.)

Wurden die Gruppen von Probentag zu Probentag miteinander verglichen, so waren keine kontinuierlichen Abweichungen von statistischer Signifikanz im Merkmal „Virustiter“ zu beobachten. Nur im Vergleich von Gruppe null zu sieben und Gruppe 28 zu 35 traten signifikante Unterschiede auf.

Die Prüfung der linearen Regression von Virustiter und Zeit ergab eine hohe Anpassung an das Modell (linear  $R^2 = 0,868$ ). Die Vermutung eines linearen Zusammenhangs zwischen „Virustiter“ und „Zeit“ kann somit bestätigt werden.



**Abbildung 16: Verlauf mittlerer ECHO-Virustiter in langgereiften Rohwürsten**

Die Prüfung der Korrelation der Variablen „Virustiter“ und „Zeit“ (Tag 0–56) ergab einen Korrelationskoeffizienten nach Pearson von -0,932 ( $r$  ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant). Demnach besteht ein sehr hoher linearer Zusammenhang zwischen „Virustiter“ und „Zeit“, wobei der Virustiter negativ korreliert mit der Zeit.

#### 4.4.5 Ergebnisse der chemischen Untersuchung langgereifter Rohwürste in Versuchsreihen mit ECHO-Virus

**Tabelle 36: Zusammensetzung langgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit ECHO-Virus**

Tag	Wasser (%)	Fett (%)	Rohprotein (%)	BEFFE (%)	BEFFE i.FE (%)
0	55,2	23,2	17,0	16,0	94,3
56	18,0	42,0	33,3	31,2	93,5

Angabe des arithmetischen Mittels jeweils aus Doppelbestimmung

BEFFE: Bindegewebeisweißfreies Fleischeiweiß

BEFFE i. FE: Bindegewebeisweißfreies Fleischeiweiß im Fleischeiweiß

Die hergestellten langgereiften Produkte entsprechen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung handelsüblicher Ware. Dabei war die charakteristische Abtrocknung der Produkte mit fortschreitender Reifedauer und damit verbundenem Anstieg im Trockensubstanzgehalt deutlich zu erkennen.

**Tabelle 37: Ergebnisse der chemischen Untersuchung langgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit ECHO-Virus**

Tag	NaCl (g/100g)	Nitrit (mg/kg)	D- MS (g/100g)	L- MS (g/100g)
0	1,9	15	0	0,28
7	-	9	-	-
14	-	-	0,22	0,28
28	-	-	0,31	0,20
42	-	-	0,38	0,18
56	4,4	-	0,45	0,10

Angabe des arithmetischen Mittels jeweils aus Doppelbestimmung  
n.n.: nicht nachweisbar, - nicht durchgeführt

Die Ergebnisse der chemischen Analyse zeigten ebenfalls produkttypische Werte. In Zusammenhang mit dem Umrötungsprozess erfolgte ein Abbau von Nitrit. Der Natriumchloridgehalt stieg dagegen mit zunehmender Reifedauer an, ebenso der Gehalt an D-Milchsäure. Der bereits an Tag null gemessene Gehalt an L-Milchsäure ist auf physiologisch im Muskelfleisch enthaltenes Laktat zurückzuführen.

#### 4.4.6 Influenzaviren in kurzgereiften Rohwürsten

Bei der Herstellung des Rohwurstbräts wurde 1 kg Brät mit 10 ml Allantoisflüssigkeit mit einer infektiösen Dosis von  $5 \times 10^{7,38}$  EID<sub>50</sub>/ml (H3N8) beziehungsweise  $5 \times 10^{7,25}$  EID<sub>50</sub>/ml (H5N6) artifiziell kontaminiert. Damit kann auf zehn Gramm Brät eine Kontamination von  $5 \times 10^{6,38}$  beziehungsweise  $5 \times 10^{6,25}$  EID<sub>50</sub> angenommen werden. Für Influenzavirus H3N8 konnte somit eine Wiederfindungsrate von 0,4 % ermittelt werden und für H5N6 eine Wiederfindung von 0,2 %.

**Tabelle 38: Probennahmetage für die virologische, mikrobiologische, chemische Untersuchung und Nachweis der Infektiösität des H3N8- und H5N6-Virus im Brutei**

Gruppe (Tag)	Temperatur	Nachweisbarkeit der Infektiösität im Ei H3N8	Nachweisbarkeit der Infektiösität im Ei H5N6
0	22 °C	+	+
1	22 °C	+	+
	7 °C	-	+
3	22 °C	n.n.	+
	7 °C	+	+
7	22 °C	n.n.	n.n.
	7 °C	+	+
10	7 °C	+	+
14		+	+
17		-	n.n.

+ Infektionsfähiges Virus nachweisbar, n.n. nicht nachweisbar, - nicht untersucht

Für Influenzavirus H3N8 konnte nach drei Tagen Lagerung bei 22 °C kein infektiöses Virus im Wurstbrät mehr nachgewiesen werden. Dagegen war bei den 7 °C gelagerten Rohwürsten ein Virusnachweis noch an Tag 14 möglich. Allerdings zeigte sich auch bei dieser Temperatur eine fortschreitende Reduktion des Virustiters.

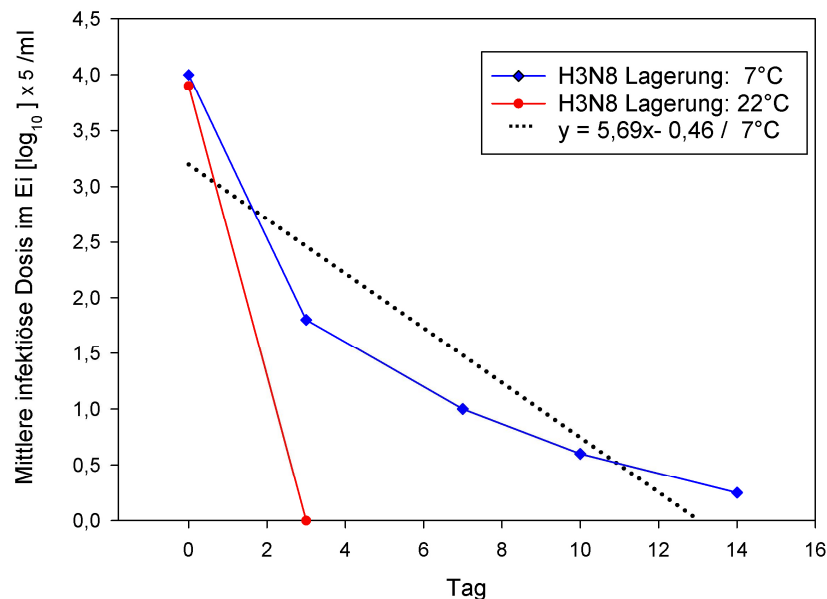
Das Geflügelinfluenzavirus H5N6 konnte in den Rohwürsten bei einer Reife- und Lagerungstemperatur von 22 °C nach drei Tagen nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr an Tag sieben. Bei den 7 °C gelagerten Produkten war ein Infektiösitätsnachweis ebenfalls noch an Tag 14 möglich, jedoch nicht mehr an Tag 17.

#### 4.4.6.1 Tenazität von Influenzavirus H3N8

Um einen Temperatureinfluss auf den Virustiter zu prüfen, wurden die Gruppen nach Tag getrennt mittels Mann-Whitney-Test für 7 °C und 22 °C miteinander verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den beiden Temperaturen ab Tag drei (mit  $p = 0,048$  an Tag drei,  $p = 0,008$  an Tag sieben,  $p = 0,008$  an Tag zehn und  $p = 0,008$  an Tag 14).

Im Vergleich der Virustiter von Tag drei bis 14 (für 7 °C) beziehungsweise drei bis sieben (für 22 °C) zum Ausgangstiter (Tag 0) zeichnete sich stets ein signifikanter Unterschied ab (mit jeweils  $p = 0,008$ ).

Die Prüfung auf eine lineare Regression von Virustiter und Zeit bei 7 °C lieferte eine hohe Anpassung an das lineare Modell mit  $R^2 = 0,890$ .



**Abbildung 17: Verlauf der mittleren infektiösen Dosis in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit Influenzavirus H3N8 in Abhängigkeit von Reife- und Lagerungstemperatur**

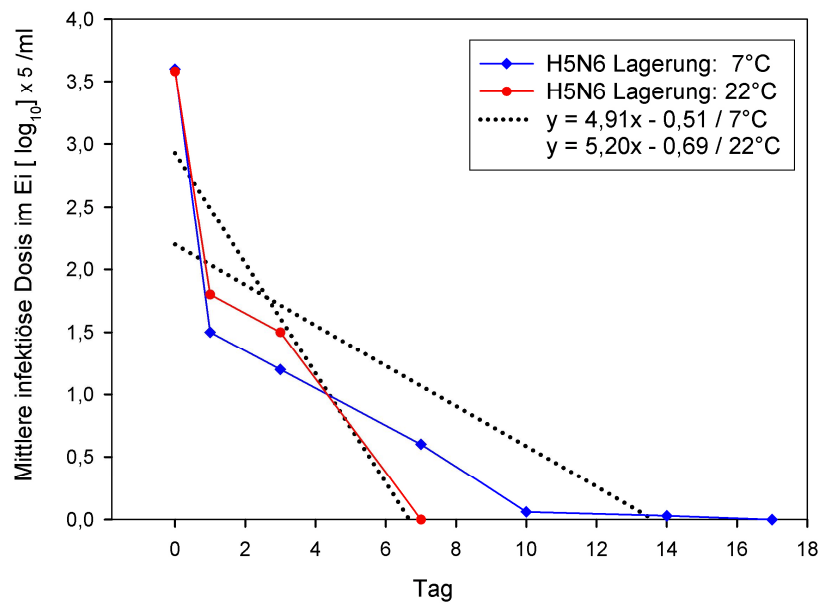
Die Prüfung der Korrelation der Variablen „Virustiter“ und „Zeit“ ergab für 7 °C einen Korrelationskoeffizienten nach Spearman von -0,946 ( $r$  ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant). Somit zeigt sich zwischen beiden Größen ein hoher linearer Zusammenhang

#### 4.4.6.2 Tenazität von Influenzavirus H5N6

Um einen Temperatureinfluss auf den Virustiter zu prüfen wurden die Gruppen analog zu H3N8 mittels Mann-Whitney-Test verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Temperaturen zeigte sich nur an Tag sieben.

Im Vergleich der Virustiter von Tag eins bis 17 zum Ausgangstiter (Tag null) ergab sich das gleiche Ergebnis wie bereits bei H3N8 beobachtet. Für beide Temperaturen zeigten sich stets signifikante Unterschiede (mit jeweils  $p = 0,008$ ).

Die Prüfung auf lineare Regression von Virustiter und Zeit lieferte mit einem Wert der Testgröße  $R^2 = 0,856$  für 7 °C und  $R^2 = 0,918$  für 22 °C jeweils eine hohe Anpassung an das lineare Modell.



**Abbildung 18: Verlauf der mittleren infektiösen Dosis in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit dem Influenzavirus H5N6 in Abhängigkeit von Reife- und Lagerungstemperatur**

Die Prüfung der Korrelation der Variablen „Virustiter“ und „Zeit“ ergab für die beiden Temperaturen Korrelationskoeffizienten nach Spearman von -0,934 bzw. -0,938 (r ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant). Daher besteht ebenfalls ein hoher linearer Zusammenhang dieser beiden Größen.

#### 4.4.7 Ergebnisse der chemische Untersuchung kurzgereifter Rohwürste in Versuchsreihen mit Influenzaviren

##### 4.4.7.1 Influenzavirus H3N8

**Tabelle 39: Zusammensetzung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus**

Tag	Wasser (%)	Fett (%)	Rohprotein (%)	BEFFE (%)	BEFFE i.FE (%)
0	54,6	27,6	16,1	14,6	90,6
14	55,3	26,1	16,2	15,8	93,1

Angabe des arithmetischen Mittels jeweils aus Doppelbestimmung

BEFFE: Bindegewebeisweißfreies Fleischeiweiß

BEFFE i. FE: Bindegewebeisweißfreies Fleischeiweiß im Fleischeiweiß

Das hergestellte Produkt entsprach in seiner Zusammensetzung handelsüblicher Ware.

**Tabelle 40: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus, Lagerung und Reifung bei 7 °C**

Tag	NaCl (g/100g)	Nitrit (mg/kg)	D-MS (g/100g)	L-MS (g/100g)	MSB/GKZ (log KbE/g)
0	2,3	33	n.n.	0,34	0/5,00
7	-	8	n.n.	0,33	0/3,66
14	2,3	-	n.n.	0,33	4,88/4,94

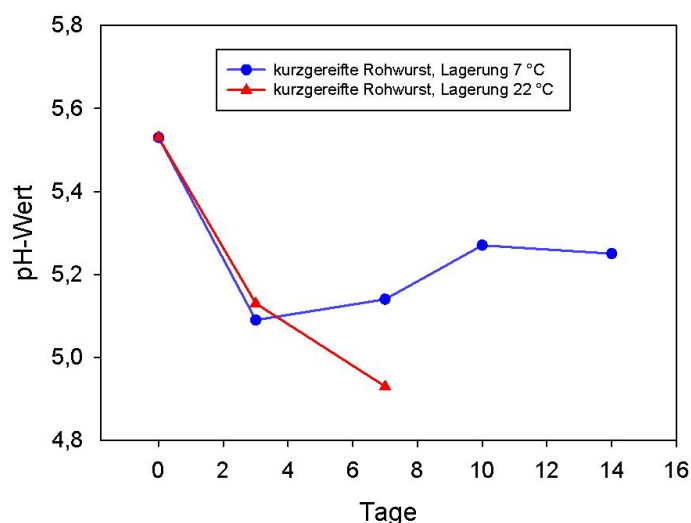
n.n. nicht nachweisbar, - nicht untersucht

**Tabelle 41: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchungen kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus, Lagerung und Reifung bei 22 °C**

Tag	NaCl (g/100g)	Nitrit (mg/kg)	D-MS (g/100g)	L-MS (g/100g)	MSB/GKZ (log KbE/g)
0	-	-	0,0	0,34	0/5,00
7	-	-	0,28	0,23	7,18/7,24

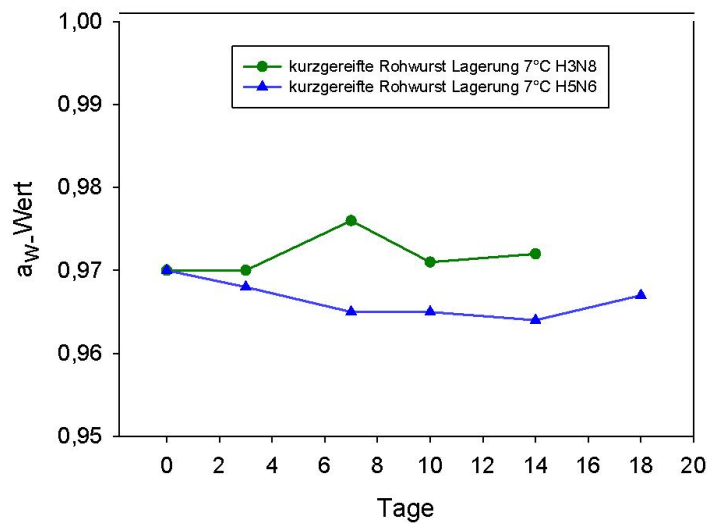
n.n. nicht nachweisbar, - nicht untersucht

Die chemische Analyse zeigte das Absinken des Nitritgehaltes. Der Anstieg in der MSB-Anzahl zeigte Unterschiede im Vergleich der beiden Temperaturen. Der Nachweis von D-Milchsäure war in den Produkten bei 7 °C nicht möglich.



**Abbildung 19: pH- Wertverläufe in kurzgereiften Rohwürsten in Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus**





**Abbildung 20: a<sub>w</sub>-Wertverläufe in kurzgereiften Rohwürsten in Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus und H5N6-Virus, Lagerung und Reifung bei 7 °C**

Bei Lagerung und Reifung der kurzgereiften Rohwürste bei 22 °C entsprach der Verlauf der a<sub>w</sub>-Werte bis Tag drei beziehungsweise sieben dem hier abgebildeten Verlauf bei 7 °C.

#### 4.4.7.2 Influenzavirus H5N6

**Tabelle 42: Zusammensetzung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H5N6-Virus**

Tag	Wasser (%)	Fett (%)	Rohprotein (%)	BEFFE (%)	BEFFE i.FE (%)
1	48,12	31,00	14,52	13,52	93,1

Angabe des arithmetischen Mittels jeweils aus Doppelbestimmungen

BEFFE: Bindegewebsweißes Fleischiweiß

BEFFE i. FE: Bindegewebsweißes Fleischiweiß im Fleischiweiß

**Tabelle 43: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H5N6-Virus, Reifung und Lagerung bei 7 °C**

Tag	NaCl (g/100g)	Nitrit (mg/kg)	D-MS (g/100g)	L-MS (g/100g)	MSB/ GKZ (log KbE/g)
0	-	30	0,0	0,28	0/4,25
7	-	21	0,1	0,31	4,59/4,69
18	-	-	0,0	0,35	7,08/7,16

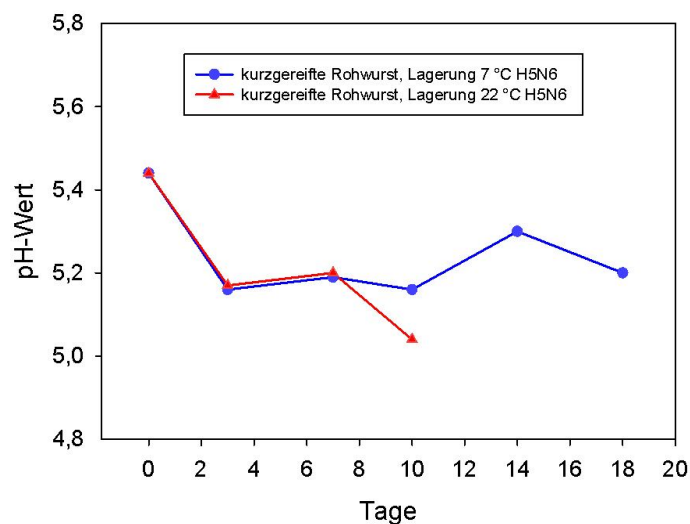
- nicht untersucht

**Tabelle 44: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H5N6-Virus, Reifung und Lagerung bei 22 °C**

Tag	NaCl (g/100g)	Nitrit (mg/kg)	D-MS (g/100g)	L-MS (g/100g)	MSB/ GKZ (log KbE/g)
0	-	27	0,0	0,28	0/4,25
7	-	5	0,08	0,30	8,03/8,40

- nicht untersucht

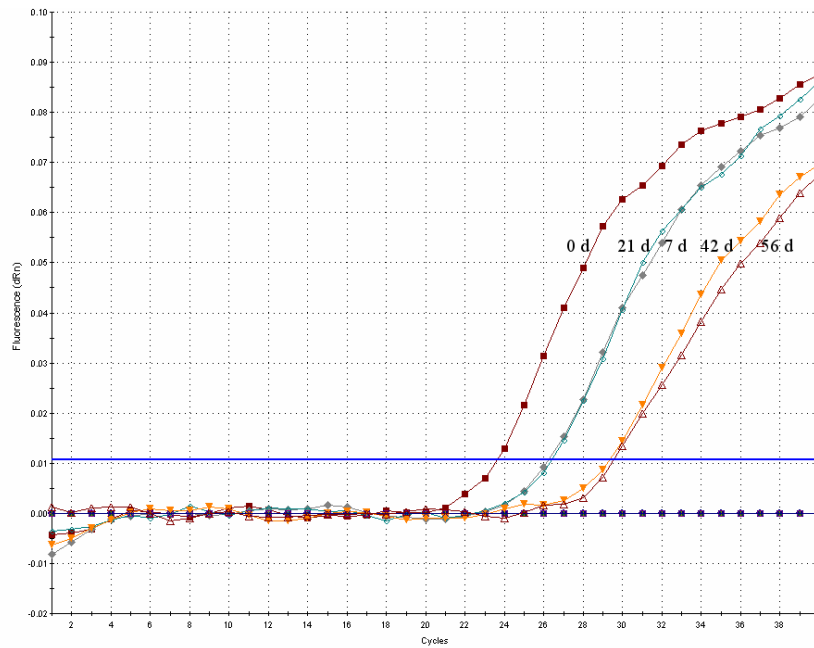
Die chemische Analyse zeigte wiederum das Absinken des Nitritgehalts und einen Anstieg der MSB. D-Milchsäure war nur in sehr geringen Mengen nachweisbar, der Gehalt an L-Milchsäure lag deutlich höher. L-Milchsäure ist auf im Muskelfleisch vorhandenes Laktat zurückzuführen.



**Abbildung 21: pH-Wertverläufe in kurzgereiften Rohwürsten in Versuchsreihen mit dem H5N6-Virus**

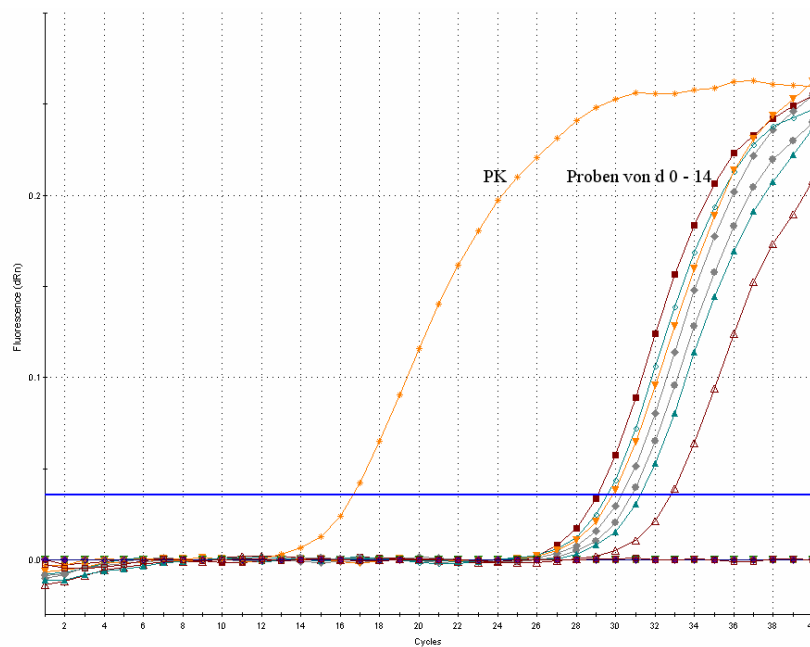
#### 4.4.8 Ergebnisse der mittels real time RT-PCR untersuchten Wurstproben

In allen mittels real time RT-PCR auf ECHO-Virus untersuchten Probenhomogenaten der kurz- und langgereiften Rohwürste konnte das entsprechende Virusgenom nachgewiesen werden (Abbildung 22- 24).



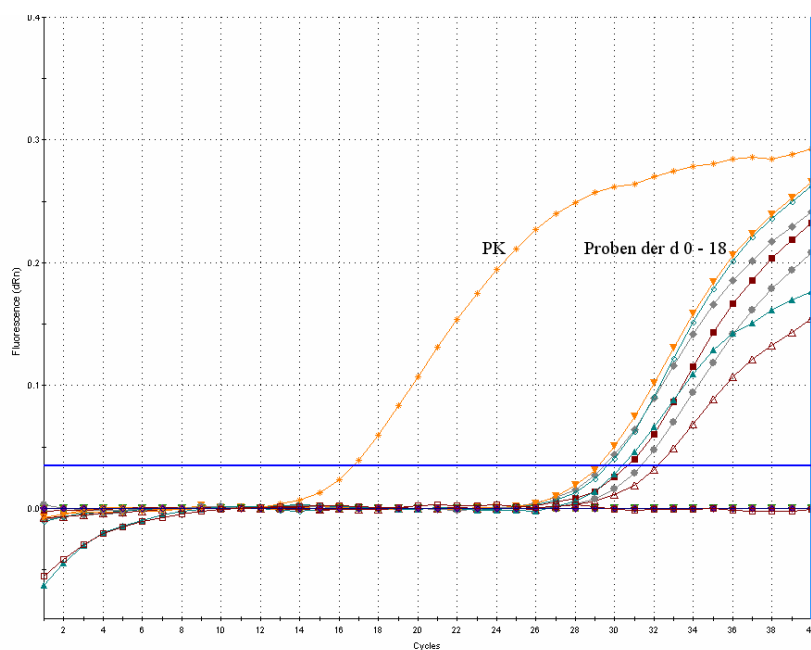
**Abbildung 22: Nachweis von ECHO-Virus in langgereiften Rohwürsten - Amplifikationskurven der real time RT-PCR**

Ebenso konnte in allen mittels real time RT-PCR auf Influenzavirus untersuchten Probenhomogenaten der kurzgereiften Rohwürste Influenza A-Virusgenom nachgewiesen werden.



**Abbildung 23: Nachweis von Influenza A-Virus in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit dem H3N8-Virus – Amplifikationskurven der real time RT-PCR**

Die Kurven zeigen in der Reihenfolge: Positivkontrolle (PK), Proben der Versuchstage: 0 d, 3 d bei 22 °C, 7 d bei 7 °C, 3 d bei 7 °C, 10 d bei 7 °C, 14 d bei 7 °C, 7 d bei 22°C.



**Abbildung 24: Nachweis von Influenza A-Virus in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit dem H5N6-Virus – Amplifikationskurven der real time RT-PCR**

Die Kurven zeigen in der Reihenfolge: Positivkontrolle (PK), Proben der Versuchstage: 7 d bei 7 °C, 3 d bei 22 °C, 3 d bei 7 °C, 0 d, 10 d bei 7 °C, 18 d bei 7 °C, 7 d bei 22 °C.

Weitere Ergebnisse zur PCR sind im Anhang dargestellt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Ziel der Arbeit

Rohwürste sind Fleischerzeugnisse, deren Bedeutung bei der Übertragung viraler Infektionserreger bisher kaum untersucht ist. Im Verlauf dieser Arbeit wurden daher Untersuchungen zur Tenazität und Inaktivierungskinetik anhand niedrigpathogener aviärer Influenzaviren und ECHO-Viren mit dem Fokus auf Rohwurstzeugnisse durchgeführt. Es sollte geklärt werden, inwieweit diese Viren nach experimenteller Kontamination der Produkte ihre Infektiosität erhalten. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen dazu beitragen, die Rolle des Lebensmittels Rohwurst als mögliche Quelle lebensmittelassoziierter Virusinfektionen besser abschätzen zu können. Weiterhin sollten Möglichkeiten einer gezielten Beeinflussung der untersuchten Viren während der Herstellung beziehungsweise Reifung und Lagerung von Rohwurstprodukten geprüft werden.

Das ECHO-Virus wurde als Vertreter der besonders stabilen Spezies der humanen Enteroviren eingesetzt. Diese Viren zeichnen sich durch eine hohe Umweltenazität aus und sind häufig in Wasser oder auch in Muscheln nachzuweisen. Sie konnten ebenfalls in einigen Lebensmitteln nachgewiesen werden.

Im Zuge der aktuellen Seuchenproblematik mit aviärer Influenza (H5N1) und der möglichen Infektionsgefahr ausgehend von kontaminierten Geflügelprodukten, wurden stellvertretend zwei niedrigpathogene Geflügelisolate, H3N8 und H5N6, für die Versuchsreihen verwendet.

### 5.2 Vorgehensweise

Zunächst wurde der Einfluss spezifischer rohwurstrelevanter Parameter *in vitro* geprüft. Dabei wurde untersucht, inwieweit die Infektiosität der Erreger durch D/L-Milchsäure, Natriumchlorid und Natriumnitrit in Abhängigkeit von Expositionstemperatur und -zeit beeinflusst werden kann. Die ausgewählten Parameter stellen Faktoren dar, die zu einer mikrobiologischen Stabilisierung von Rohwurstprodukten wesentlich beitragen. Aufgrund der Komplexität der Rohwurstzusammensetzung und -matrix sollte anhand der Prüfung einzelner Faktoren eine gezielte Aussage zu deren Wirkung ermöglicht werden. Die Auswahl der Natriumchlorid-, Natriumnitrit- sowie Milchsäurekonzentrationen für die Versuchsreihen orientierte sich an produkttypischen Gehalten. Dabei sollte die ausgewählte Spannbreite die Verhältnisse in Rohwurstprodukten möglichst repräsentativ erfassen. Anschließend erfolgten Versuchsreihen mit experimentell viruskontaminierten kurz- und langgereiften Rohwürsten.

Die Herstellung der Rohwürste erfolgte nach praxisüblicher Rezeptur und Technologie. Auf den Einsatz von Starterkulturen wurde aus Gründen der Standardisierbarkeit jedoch verzichtet. Ebenso verzichtet wurde auf den Einsatz von Gewürzen mit Ausnahme von Pfeffer. Mögliche Einflüsse dieser beiden Parameter sollten in diesen Studien nicht untersucht werden.

### 5.3 Versuchsaufbau

Der Virusnachweis von ECHO-Virus erfolgte aufgrund der guten Anzüchtbarkeit in der Zellkultur. Die Kultivierbarkeit gilt dabei als eindeutiges Zeichen für eine Infektiösität. Die Aussage, vermehrungsfähiges, infektiöses Virus in den Versuchen nachzuweisen, war von besonderem Interesse, um ein mögliches Infektionsrisiko für Verbraucher abschätzen zu können.

*In vitro* wurde der Einfluss von sieben Konzentrationen an Natriumchlorid, davon drei unter Zusatz von Natriumnitrit, sowie vier Konzentrationen an D/L-Milchsäure untersucht. Dieser Einfluss wurde bei zwei Temperaturen und für zwei Versuchszeiten geprüft.

Für die entsprechenden *in vitro*-Versuche mit Influenzaviren wurden die Versuchsreihen reduziert. Es wurde hier der Einfluss von drei Konzentrationen an Natriumchlorid und drei Konzentrationen an Milchsäure jeweils bei zwei Temperaturen und zu drei Zeitpunkten getestet. Der Grund für die Reduktion der Versuchsreihen liegt in der arbeits- und zeitaufwendigen Methode des Virusnachweis im Brutei. In Vorversuchen wurde die Kultivierung der beiden Influenzaisolate in MDCK-Zellkultur gegenüber dem Brutei verglichen. Dabei wurden in Zellkultur stets geringere Virustiter beobachtet als vergleichsweise im Brutei.

Dass einzelne Influenzavirus-Isolate in Zellkultur nur schlecht replizieren, wurde schon von STUART-HARRIS u. SCHILD (1976) beschrieben. ASAOKA *et al.* (2006) konnte eine verminderte Kultivierbarkeit verschiedener H3N2-Isolate in MDCK-Zellen beobachten. Er konnte das Phänomen auf eine geringe Rezeptoraffinität dieser Viren zurückführen.

Von einem Virusnachweis von Influenzaviren in Zellkultur wurde aufgrund der geringen erzielten Virustiter abgesehen und auf den Nachweis im Brutei zurückgegriffen. Für die geplanten Versuchsreihen erwies sich ein Einsatz möglichst hoher infektiöser Dosen zur Beurteilung einer Inaktivierungskinetik und Tenazität als notwendig, welche mittels Anzucht in MDCK-Zellen nicht zu erreichen waren. Die Nachweismethode im Brutei stellt eine der sensitivsten Verfahren dar, um infektiöse Viren nachzuweisen. Die Frage nach der

Infektionsfähigkeit lässt sich mit anderen Methoden des Virusnachweis wie beispielsweise HA-Test oder PCR nur ungenügend beziehungsweise nicht beantworten.

## **5.4 Ergebnisse**

### **5.4.1 Nachweis der Viren mittels real time RT-PCR**

Parallel zu dem Virusnachweis in Zellkultur und Brutei erfolgte aus den Probenhomogenaten der Rohwürste zusätzlich ein qualitativer Erregernachweis mittels real time RT-PCR.

In allen untersuchten Wurstproben konnte ECHO-Virus detektiert werden. Ebenso konnte Influenza A-Virus bei allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Für Influenza-Viren zeigte sich allerdings eine Diskrepanz des Virusnachweises mittels PCR gegenüber dem Infektiösitätsnachweis im Brutei. In allen mittels PCR untersuchten Proben konnte Influenza A-Virus detektiert werden, welches jedoch nicht in gleichem Maße im Brutei replizieren konnte. Der Nachweis von viralem Genom in der PCR ist nicht gleichzeitig mit der Infektiösität viraler Partikel assoziiert. So können Fragmente des viralen Genoms nachgewiesen werden, auch wenn bereits ein Verlust der Infektionsfähigkeit beziehungsweise eine Degradation der Partikel eingetreten ist. Daher wurde zur Abschätzung eines möglichen Infektionsrisikos besonderes Augenmerk auf den Infektiösitätsnachweis im Brutei gelegt beziehungsweise den Infektiösitätsnachweis in der Zellkultur.

### **5.4.2 Einfluss von Natriumchlorid und Natriumnitrit auf ECHO-Virus**

Unter den geprüften Versuchsbedingungen zeichneten sich ECHO-Viren durch große Stabilität gegenüber Natriumchlorid Konzentrationen von bis zu 20 % aus. Durch die Zugabe von Nitrit wurde kein zusätzlicher Effekt beobachtet, ebenso wenig ein Einfluss der Temperatur oder der Zeit auf eine Virusinaktivierung. In dieser Versuchsreihe zeigten die unbehüllten Enteroviren mit pH-Werten im neutralen Bereich eine hohe Stabilität. Eine Virusinaktivierung wurde in den Versuchsreihen nicht beobachtet.

Dass Natriumchlorid eine Verstärkung der Virusinaktivierung bewirkt, wurde von SALO u. CLIVER (1976) gegenüber Polio-Viren beobachtet. Die Zugabe von 0,1 molarer NaCl-Lösung zu verschiedenen Pufferlösungen führte bei pH-Werten von 2,8 bis 3,7 zu einer vergleichsweise stärkeren Virusinaktivierung als ohne Zusatz von NaCl. Bei höheren pH-Werten im Bereich von 4,5 bis 6,5 ließ sich die Kochsalzwirkung nur in Zusammenhang mit einer starken Konzentrationssteigerung beobachten. Im Versuch mit ECHO-Virus 7 zeigte

sich bei Zugabe von NaCl (0,5mol) bei pH-Werten von 3 - 6 ebenfalls eine stärkere Reduktion der Infektiösität. Es ist daher anzunehmen, dass Kochsalz seine antivirale Wirkung gegenüber Enteroviren nur in sehr hohen Konzentrationen beziehungsweise bei sehr niedrigen pH-Bereichen entfalten kann.

Nitrit ist Bestandteil von Pökelsalz und besitzt eine direkte keimhemmende Wirkung gegenüber zahlreichen Mikroorganismen. Der Wirkungsmechanismus von Nitrit beruht auf der Hemmung von Enzymen, der Bindung von Eisen und der Beeinflussung von Elektronentransporten (WIRTH 1980). Diese Art von Hemmmechanismen spielt bei der Inaktivierung von Viren keine Rolle. In Untersuchungen mit ECHO- und Polio-Viren in Salami und Zervelatwurst konnte experimentell mit drei verschiedenen Nitrit-Konzentrationen (von 37,5 bis 150 ppm) kein Einfluss gegenüber der Kontrolle ohne  $\text{NaNO}_2$  beobachtet werden (KANTOR u. POTTER 1975). Die Ergebnisse der Studie belegen eigene Untersuchungen zum Einfluss von Nitrit auf ECHO-Viren im *in vitro*-Modell. Hier konnte ebenfalls keine Wirkung durch die Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  ermittelt werden. Somit erscheint eine antivirale Wirkung von Nitrit gegenüber Enteroviren in Konzentrationen bis 200 ppm, als unwahrscheinlich.

#### **5.4.3 Einfluss von D/L-Milchsäure auf ECHO-Virus**

In den Versuchsreihen mit D/L-Milchsäure zeigten ECHO-Viren ebenfalls eine hohe Stabilität. Eine signifikante Reduktion im Virustiter konnte nur bei Inkubation mit 0,4 % Milchsäure im Vergleich von drei zu sieben Tagen beobachtet werden. Diese Reduktion erfolgte bei beiden Versuchstemperaturen gleichermaßen.

Es stellt sich die Frage, ob dieser von der Temperatur als unabhängig beobachteter Effekt allein auf einer Wirkung des pH-Wertes (3,22–3,26 im Versuch) basiert oder auf einer zusätzlichen von Milchsäure ausgehenden Wirkung. Für Bakterien ist bekannt, dass neben dem pH-Wert auch die Art der Säure bei der Inaktivierung eine wichtige Rolle spielt – je nachdem wie gut eine undissoziierte Säure die Bakterienmembran penetrieren kann und auf intrazelluläre Prozesse einwirkt (BOOTH u. KROLL 1989). Dabei erweist sich Milchsäure in der Wirkung gegenüber Mikroorganismen schwächer wirksam als andere organische Säuren. So konnte EKLUND (1990) im Vergleich organischer Säuren hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit folgende Abstufung beobachten: Milchsäure  $\leq$  Essigsäure  $\leq$  Propionsäure  $\leq$  Sorbinsäure  $\leq$  Benzoesäure.

Für Rotaviren, welche ebenfalls unbehüllte RNA Viren von großer Stabilität darstellen, wurde in einer Studie der Temperatureinfluss in sauren Medien untersucht. Dabei konnte kein Unterschied in der Wirkung zwischen Milchsäure und Essigsäure festgestellt werden (WOOD



u. ADAMS 1992). Der antivirale Effekt von schwach organischen Säuren wird daher eher auf die Wirkung des niedrigen pH-Wertes als auf die Wirkung der Säure zurückgeführt. Dass antivirale Effekte unabhängig der verwendeten Säure in Folge einer pH-Wertsenkung auftreten, wurde bereits in früheren Untersuchungen mit Rotaviren geäußert (WEISS u. CLARK 1985, RODGER *et al.* 1977).

Da es sich bei Viren im Gegensatz zu Bakterien nicht um lebende Zellen handelt, ist der Mechanismus der Säureinaktivierung nicht an das Unterbrechen essentieller Stoffwechselvorgänge gekoppelt. Ein Verlust der Infektiosität ist als wahrscheinliche Folge einer Alteration der Nukleinsäure, des Kapsids beziehungsweise beider Strukturen zu vermuten (SALO u. CLIVER 1976). Bei unbehüllten Viren erfolgt eine Inaktivierung bei niedrigen pH-Werten mutmaßlich über eine Denaturierung von Kapsidproteinen (RODGER *et al.* 1977). Nach Haas *et al.* (1995) wirken anorganische Säuren nur über die pH-Wertabsenkung inaktivierend auf Viren. Organische Säuren können darüber hinaus über Interaktionen mit lipophilen Oberflächenstrukturen behüllter Viren eine inaktivierende Wirkung entfalten.

In eine Studie von SALO u. CLIVER (1978) wurde der Einfluss von Zitronen- und Ascorbinsäurelösungen auf die Inaktivierung von Enteroviren untersucht. Ascorbinsäure und Zitronensäure unterschieden sich bei gleichem pH-Wert und gleicher Inkubationszeit deutlich in ihrer Wirkung gegenüber Polio-Virus. Eine deutliche Reduktion im Virustiter wurde nur für Ascorbinsäure beobachtet.

Somit lässt sich auch gegenüber unbehüllten Viren neben dem pH-Wert Effekt eine Wirkung organischer Säuren in Abhängigkeit der Säureart vermuten.

In den eigenen *in vitro*-Versuchsreihen wurde der Einfluss von Salzsäure unter analogen Bedingungen zu Milchsäure geprüft. Hinsichtlich der beobachteten Virustiter zeigte sich im Ergebnis mit Salzsäure eine weitgehende Übereinstimmung mit den Resultaten der Milchsäurereihe. Allerdings ist diese Übereinstimmung aufgrund der geringen Anzahl der Versuchsdurchführungen mit Salzsäure (n=2) als eher tendenziell zu sehen.

Auch wenn in den Versuchsreihen mit D/L-Milchsäure und Salzsäure kein Temperatureinfluss beobachtet werden konnte, so ist die Temperatur als wichtiger Einflussfaktor zu berücksichtigen. In Inaktivierungsstudien mit Enteroviren in Pufferlösungen mit pH-Bereichen von 3 bis 9 wurden Polio- und Coxsackie-Virus bei 30 °C in bedeutend kürzeren Zeiträumen inaktiviert als bei 2 °C (SALO u. CLIVER 1976). Der Einfluss einer Temperaturerhöhung auf die Inaktivierung wurde auch in anderen Studien mit Enteroviren beobachtet (siehe 2.2.6, BAGDASARYAN 1964, HURST *et al.* 1989, TIRON 1992).

#### **5.4.4 Versuchsreihen mit Rohwurst**

Die Betrachtung der Viren in der Rohwurstmatrix erfolgt vor einer sehr komplexen Summe von Einflussfaktoren. Einzelne Faktoren sind immer im gesamten Wirkungssystem in Wechselwirkung mit anderen Faktoren zu betrachten. Rohwurst ist durch ein komplexes Zusammenspiel chemischer, physikalischer und mikrobieller Mechanismen gekennzeichnet.

##### **5.4.4.1 Rohwurstprodukte**

In Hinblick auf ihre Zusammensetzung entsprachen die hergestellten kurz- und langgereiften Rohwürste handelsüblichen Erzeugnissen. Die Messung der pH- und  $a_w$ -Werte sowie die Bestimmung der Keimzahlen erfolgte sowohl in den Virus-kontaminierten Produkten als auch in den unbeimpften Kontrollproben. Die chemische Analyse wurde aus Gründen der Laborsicherheit nur anhand der nicht-kontaminierten Kontrollen durchgeführt. Die Verwendung gleicher Rohmaterialien und identischer Rezepturen sowie die Herstellung unter gleichen Bedingungen erlauben im Rückschluss auf die infizierten Wurstprodukte die Annahme gleicher Bedingungen.

Hinsichtlich der Nitritgehalte in den Rohwürsten variierten die wiedergefundenen Werte an Tag null beziehungsweise eins zwischen 15 und 104 ppm. Warum die Anfangswerte in den langgereiften Würsten der ECHO-Virus Versuchsreihe (15 ppm) und in kurzgereiften Würsten mit Influenzavirus H3N8 (33 ppm) so niedrig lagen ist fraglich. Möglicherweise war die Zeit zwischen Herstellung und chemischer Analyse über ein Einfrieren und Auftauen der Proben unterschiedlich lang, so dass eine fortschreitende Nitritumsetzung stattfand.

Bezüglich der Gehalte an D-Milchsäure wurde in den kurzgereiften Rohwürsten mit ECHO-Virus ein typischer Anstieg bis zum Tag 28 beobachtet, wobei die Gehalte in den Würsten bei der 7 °C Lagerung etwas niedriger lagen als bei 22 °C. Dies ist mit einer geringeren Aktivität der MSB bei Kühltemperaturen zu erklären.

Bei den Untersuchungen zur Tenazität von Influenzavirus H3N8 in kurzgereiften Produkten konnte nach 14 Tagen bei der 7 °C Lagerung keine D-Milchsäure gemessen werden. Ein Anstieg in der Anzahl der MSB und der GKZ erfolgte nur mäßig. Ein fehlender Gehalt an D-Milchsäure deutet auf eine mangelhafte Fermentation in den Rohwürsten hin, welche in diesem Fall mit der geringeren Anzahl an milchsäurebildenden Bakterien in Verbindung gebracht werden kann. Der gemessene Gehalt an L-Milchsäure lässt sich auf physiologisches Muskellaktat zurückführen.

In den kurzgereiften Rohwürsten mit Influenzavirus H5N6 wurden bei beiden Temperaturen übliche Keimzahlen beobachtet, jedoch kaum eine D-Milchsäurebildung. Eine mangelhafte Laktatbildung trotz hoher Keimzahlen kann auftreten, wenn entsprechend D-milchsäurebildende Keime in der Rohwurstflora fehlen.

In den Versuchen mit Rohwürsten wurde das Darstellen praxisnaher Verhältnisse angestrebt. Die hergestellten kurz- und langgereifte Rohwürste entsprachen in ihren Kennzahlen weitgehend handelsüblichen Waren und können somit als repräsentativ für die Produktgruppe der Rohwürste angesehen werden.

#### **5.4.4.2 Methodik der experimentellen Rohwurstkontamination**

Eine experimentelle Kontamination von Rohwurstprodukten mit Viruspartikeln ist bisher in der Literatur kaum beschrieben. Für die Versuchsreihen mit kurz- und langgereiften Rohwürsten wurde daher in separaten Vorversuchen eine Methodik entwickelt. Während des maschinellen Kuttervorganges wurde das Rohwurstbrät experimentell mit Virussuspension beimpft. Anhand der direkten Entnahme von Proben aus der Kutterschüssel wurde die Verteilung der Viruspartikel im Rohwurstbrät geprüft. Für die Aufbereitung der Brätproben zum Virusnachweis in Zellkultur wurden ein übliches Stomacherverfahren für die Aufbereitung von Lebensmittelproben mit anschließender Zentrifugation sowie Sterilfiltration angewandt.

Aus allen untersuchten Brätproben war eine Virusisolierung in Zellkultur beziehungsweise Brutei mit geringen Abweichungen im Virustiter möglich. Die ermittelten Wiederfindungsraten im Anschluss an die Herstellung lagen höher für ECHO-Virus (mit 2 % und 3,8 % im Rohwurstbrät) und etwas niedriger für Influenzavirus (mit 0,4 % für H3N8 und 0,2 % für H5N6 im Rohwurstbrät). Bei Anwendung gleicher Herstellungsprotokolle sind die geringeren Wiederfindungsraten für Influenzavirus möglicherweise mit einer geringeren Stabilität und schnellerem Infektionsverlust der Influenzaviruspartikel zu erklären. Ob die Wiederfindungsraten mittels weiterer Verfahren von Virusaufkonzentrierung noch erhöht werden können, wurde nicht geprüft. Insgesamt lassen Wiederfindungen zwischen 0,2 bis 3,8 % in Anbetracht der experimentell eingesetzten hohen Kontaminationsdosen eine ausreichend hohe Partikeldichte nach dem Einmischen im Wurstbrät annehmen. Die erfolgreiche Virusisolierung aus allen untersuchten Brätproben in Verbindung mit nur geringen Abweichungen im Virustiter lassen auf eine verhältnismäßig homogene Verteilung der Viruspartikel im Wurstbrät rückschließen. Dennoch kann eine variable Konzentration von Viruspartikeln in verschiedenen Kompartimenten der Rohwurstmatrix nicht ausgeschlossen werden.

Ein nachteiliger Effekt durch die Zugabe flüssiger Virussuspension beziehungsweise Zellkulturmedium auf die Beschaffenheit des Rohwurstbrätes oder Rohwurstreifung wurde bei den verwendeten Mengen nicht beobachtet.

#### **5.4.5 Tenazität von ECHO-Virus in kurz- und langgereiften Rohwürsten**

In den Versuchen mit kurzgereiften Rohwürsten konnte über den untersuchten Zeitraum von 28 Tagen eine temperatur- und zeitabhängige Reduktion des Virustiters beobachtet werden. An Tag 28 betrug die Gesamtreduktion des Titers bei 22 °C Lagerung zwei  $\log_{10}$ -Stufen. Bei 7 °C erfolgte eine Reduktion um insgesamt eine  $\log_{10}$ -Stufe.

In den langgereiften Produkten konnte, ähnlich den kurzgereiften Würsten bei 22 °C, eine kontinuierliche Abnahme des Virustiters verzeichnet werden. An Tag 56 betrug die Gesamtreduktion 2,5  $\log_{10}$ -Stufen.

Ein Temperatureinfluss wurde vor allem bei den kurzgereiften Rohwürsten deutlich. Bei 22 °C erfolgte eine schnellere Reduktion im Virustiter. An Tag 21 und 28 der Reifung bestand ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Lagerungstemperaturen.

In den *in vitro*-Untersuchungen wurde kein Einfluss von Natriumchlorid in Konzentrationen bis 20 % auf ECHO-Viren beobachtet. Daher erscheint eine antivirale Wirkung von Kochsalz in rohwrustüblichen Mengen von 2 % bis 3 % in der Rohwurst als höchst unwahrscheinlich. Bei den *in vitro*-Versuchen mit Milchsäure wurde im relevanten pH-Wert Bereich um 5 ebenfalls keine Wirkung auf ECHO-Viren ermittelt. Dennoch stellt sich die Frage, ob in Summe auch geringe Salzgehalte in Verbindung mit den rohwrusttypischen pH-Werten und höherer Reifetemperatur einen Effekt auf die Inaktivierung der ECHO-Viren ausüben. Die Wirkung einer Kombination der Einflussfaktoren Natriumchlorid, pH- Wert und Temperatur gegenüber ECHO-Viren wurde *in vitro* nicht untersucht und kann daher auch für die Rohwurst nur unzureichend beurteilt werden.

Die für langgereifte Rohwurstprodukte charakteristische Abtrocknung ließ den  $a_w$ -Wert im Laufe der beobachteten Reifung auf Werte nahe 0,70 sinken. Verschiedene Studien zur Virustenazität konnten einen Einfluss des Feuchtigkeithaltes auf die Tenazität der Viren in der Umwelt aufzeigen. So konnte beobachtet werden, dass eine hohe relative Feuchtigkeit die Tenazität von Enteroviren begünstigte, wohingegen sich bei Hepatis A- und Rotaviren eine geringe Feuchtigkeit positiv auf die Tenazität auswirkte (SATTAR *et al.* 1986, SATTAR *et al.* 1988, MBITHI *et al.* 1991).

In Studien zur Tenazität von Enteroviren auf Gemüseoberflächchen war bei Eintrocknen des Inokulums kein infektiöses Virus mehr nachzuweisen (KONOWALCHUK u. SPEIRS

1975). Nach dem Trocknen von Bodenproben konnte, im Vergleich zu ungetrockneten Proben, nach 25 Tagen ebenso kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen werden (BAGDASARYAN 1964).

In langgereiften Rohwürsten sinkt mit fortschreitender Abtrocknung der Wassergehalt im Produkt deutlich ab. Der Abtrocknungsprozess ist jedoch nicht mit dem Prozess des Eintrocknens zu vergleichen. In Rohwürsten werden die Viren von einer heterologen Matrix aus Fett und Protein umgeben, welche die Viren mutmaßlich vor einer Austrocknung schützt. Somit erscheint ein inaktivierender Einfluss des  $a_w$ -Wertes in Rohwurst auf die Enteroviren eher unwahrscheinlich. In gefriergetrockneten Produkten mit sehr geringer Feuchtigkeit (low moisture foods) konnte von CLIVER *et al.* (1970) eine hohe Stabilität von ECHO- und Polio-Virus beobachtet werden. Die Viren zeigten eine Persistenz von bis zu zwei Monaten.

Obwohl bei der Herstellung keine Starterkulturen eingesetzt wurden, zeichneten sich die Rohwürste durch charakteristisch hohe Keimzahlen mit Dominanz von Milchsäurebakterien aus. Es ist bekannt, dass von Bakterien gebildete Proteine oder Peptide, sogenannte Bakteriozine, auf andere Bakterien hemmend bzw. abtötend wirken (beispielsweise Nisin, Sakazin, Enterocine, Pediocine). Ob Bakteriozine auch gegenüber Viren eine inaktivierende Wirkung entfalten können, ist dagegen kaum bekannt. In den Versuchen mit Rohwürsten konnte die Infektiosität von ECHO-Viren trotz hoher Keimgehalte kaum beeinflusst werden. Eine antivirale Wirkung bakterieller Stoffwechselprodukte scheint daher eher von untergeordneter Bedeutung zu sein. In der Studie von KANTOR und POTTER (1975) wurden trotz hoher Keimzahlen in den Rohwürsten ebenfalls keinerlei Effekte auf die Tenazität der untersuchten Viren beobachtet.

Eine gezielte Untersuchung zum Einfluss von Starterkulturen gegenüber Viren ist dennoch von Interesse. Die Frage, ob bestimmte Bakteriozine oder bakterielle Stoffwechselprodukte antivirale Wirkungen in Rohwürsten entfalten, ist bisher unzureichend untersucht.

Gleiches gilt für den Einfluss verschiedener Gewürze und Pflanzenextrakte. Über mögliche antivirale Wirkung von Phytozinen in Rohwürsten ist ebenfalls kaum etwas bekannt.

Für verschiedene Fruchtsäfte konnten virusinaktivierende Eigenschaften gegenüber Enteroviren aufgezeigt werden. KONOWALCHUK u. SPEIRS (1978) fanden eine virusinaktivierende Wirkung in frisch hergestellten und kommerziellen Apfelsäften gegenüber Polio- und Coxsackievirus. Dabei zeigte sich frischer Apfelsaft effektiver in der Wirkung als hitzebehandelte Apfelsaftgetränke. Eine antivirale Wirkung gegenüber Polio-, ECHO- und Coxsackie-Viren zeigte auch Traubensaft sowie Tee gegenüber Polio-Viren. Die antivirale Wirkung von Apfel- und Traubensaft kann dabei wahrscheinlich auf die enthaltenen

Polyphenole, insbesondere auf Tannine, zurückgeführt werden (KONOWALCHUK u. SPEIRS 1978).

Eine gezielte Untersuchung zum antiviralen Einfluss von Gewürzen und pflanzlichen Extrakten, welche in der Rohwurstherstellung Anwendung finden, ist daher ebenfalls von Interesse.

In den Versuchsreihen mit ECHO-Virus wurden die hergestellten Rohwürste einem Räucherungsverfahren unterzogen (siehe 3.2.6.3.2) Räucherrauch stellt ein Gemisch aus Hunderten von chemischen Substanzen dar. In der Gasphase sind vor allem Phenole und Carbonyle vorhanden, daneben organische Säuren, Alkohole, Furane, Lactone, aromatische Verbindungen (HILDEBRADT 2004). Ob einzelne Substanzen im Räucherrauch antivirale Wirkungen entfalten und diese auch in den Rohwürsten und nicht ausschließlich auf deren Oberfläche beschränkt zur Wirkung gelangen, kann anhand der durchgeführten Versuchsreihen nicht eingehend beurteilt werden. Das ECHO-Virus zeigte in den Rohwürsten trotz Räucherung eine hohe Tenazität. Nach dem Prozess des Räucherns konnte keine verstärkte Reduktion im Virustiter im Vergleich zu den anderen Probenahmezeitpunkten beobachtet werden.

#### **5.4.6 Einfluss von Natriumchlorid auf Geflügelinfluenzavirus H3N8**

Im Gegensatz zu ECHO-Viren handelt es sich bei Influenzaviren um behüllte Viren, die gegenüber äußeren Einflüssen wie extremen pH-Werten, Hitze oder Trockenheit etc. wesentlich größere Empfindlichkeit zeigen.

In der *in vitro*-Versuchsreihe mit NaCl konnte in Abhängigkeit von Temperatur, Zeit und Salzkonzentration ein Einfluss auf die Inaktivierbarkeit von H3N8 beobachtet werden.

Mit steigender Salzkonzentration zeigte sich eine vermehrte Inaktivierung der Viren. Die Inaktivierung erfolgte bei einer Temperatur von 20 °C stärker als bei 4 °C. Eine Inkubation mit 12 % NaCl bei 20 °C führte nach zehn Tagen schließlich zum völligen Infektionsverlust von H3N8.

Der in den Studien von BROWN *et al.* (2007) und STALLKNECHT *et al.* (1990a) beschriebene Zusammenhang zwischen einer Erhöhung des Salzgehaltes und Beschleunigung der Inaktivierung, kann anhand der eigenen Untersuchungsergebnisse mit Influenzavirus H3N8 bestätigt werden, ebenso der beobachtete Temperatureffekt. Das Einwirken höherer Temperaturen beschleunigt die Inaktivierung von aviären Influenzaviren.

#### 5.4.7 Einfluss von D/L-Milchsäure auf Geflügelinfluenzavirus H3N8

In den durchgeführten Versuchsreihen konnte ein Einfluss von D/L-Milchsäure auf das Influenzavirus H3N8 beobachtet werden. Nach einstündiger Inkubationszeit mit 0,2 %iger Milchsäure konnte eine von der Temperatur unabhängige Inaktivierung festgestellt werden (pH-Wert 3,80–3,91). Eine Inaktivierung erfolgte ebenso bei Inkubation mit 0,15 %iger Milchsäure für beide geprüften Temperaturen binnen 72 Stunden (pH-Wert 4,38–4,70). Keine Inaktivierung wurde nach drei Tagen Expositionszeit mit 0,1 %iger Milchsäure (pH 5,8–5,99) beobachtet.

Studien zur pH-Toleranz von aviären Influenzaviren haben eine Stabilität der Viren für den neutralen Bereich bis 8,5 gezeigt (GLATHE *et al.* 1982, Lang *et al.* 1968). Bei niedrigen pH-Werten (< 5) erfolgt im HA-Molekül von AIV eine Konformationsänderung, welche die Voraussetzung für eine Fusion von Virusmembran mit endosomaler Membran in der Wirtszelle darstellt (DOMS *et al.* 1985, WEBSTER *et al.* 1988). Für eine optimale Fusion muss das Virus bereits vor Exposition niedriger pH-Werte an die Zielmembran gebunden sein (STEGMANN *et al.* 1987, WHITE *et al.* 1982). Nach SATO *et al.* (1982) trat ein irreversibler Verlust der Fusionsaktivität bei Inkubation im sauren Medium (pH 5,0) und einer Expositionstemperatur von 37 °C ein. Dagegen konnte STEGMANN *et al.* (1987) bei Kühltemperatur (0 °C) keinen Verlust der Fusionsfähigkeit bei pH 5 beobachten. Ein Temperatureffekt wurde bei Alteration im HA-Molekül vermutet (SATO *et al.* 1982, STEGMANN *et al.* 1987). PURI *et al.* (1990) konnten in ihren Studien wiederum eine Variabilität von Virussubtypen beobachten. Nach einer 15-minütigen Inkubation im sauren Medium (pH 5,0) zeigte ein Virusisolat vom Subtyp H3 vollständigen Infektionsverlust, wohingegen ein H2-Subtyp infektiös blieb.

In umfangreichen Studien mit Influenza A-Viren zum Einfluss des pH-Wertes auf die Stabilität der Infektiösität und Hämagglutininaktivität konnten SCHOLTISSEK *et al.* (1985) eine Korrelation zwischen der pH-Stabilität und dem Hämagglutinin-Subtyp beobachten. Die Inaktivierungsstudien wurden bei 20 °C und verschiedenen pH-Wertabstufungen durchgeführt. Als relativ stabil zeigten sich alle untersuchten H3-Stämme, welche ihre Infektiösität bei pH-Werten zwischen 5,1 und 5,4 verloren. Relativ labil zeigten sich alle untersuchten Isolate der Subtypen H7 und H5 (Infektiösitätsverlust bei pH 5,6 bis 6,0). Als intermediär hinsichtlich ihrer pH-Stabilität erwiesen sich die untersuchten H1-Stämme. Dabei zeigten Stämme mit bereits gespaltenem Hämagglutininmolekül eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber niedrigen pH-Werten als Stämme mit nicht gespaltenem HA-Molekül. In den eigenen Versuchsreihen mit H3N8 zeigte sich eine erhaltene Infektiösität bei Inkubation mit pH-Werten von 4,38–4,70 (0,15 % MS) nach 24 Stunden, bei 20 °C und 4 °C.

Somit ergeben sich Abweichungen zu den Beobachtungen von SCHOLTISSEK *et al.* (1985) zur Inaktivierung von H3-Influenzavirussubtypen.

Obwohl in der Versuchsreihe mit D/L-Milchsäure kein Temperatureinfluss beobachtet werden konnte, ist dieser Effekt aufgrund des begrenzten Versuchsumfanges nicht auszuschließen. Wie in anderen *in vitro*-Studien beobachtet wurde, führten höhere Temperaturen schneller zu einer Inaktivierung (STALLKNECHT *et al.* 1990a, b, BROWN *et al.* 2007). Dies konnte u.a. auch in praktischen Versuchen bei der Inkubation von AIV-Isolaten in Hühnermist ermittelt werden (BEARD *et al.* 1984, LU *et al.* 2003).

Ob Milchsäure neben dem pH-Effekt eine eigene Wirkung gegenüber Influenzaviren entfaltet, konnte mit den durchgeführten Versuchsreihen nicht überprüft werden. Organischen Säuren können zusätzlich über Interaktionen mit lipophilen Oberflächenstrukturen behüllter Viren inaktivierend wirken (HAAS *et al.* 1995). Ein Vergleich mit der Wirkung anderer organischer Säuren auf AIV wurde in den Versuchsreihen nicht durchgeführt. Die in den pH-Studien von SCHOLTISSEK *et al.* (1985) gewonnenen Ergebnisse wurden unter Verwendung von Essigsäure beobachtet.

#### **5.4.8 Tenazität der Influenzaviren in kurzgereiften Rohwürsten**

In den Untersuchungen mit kurzgereifter Rohwurst wurde eine temperatur- und zeitabhängige Inaktivierung der beiden Influenzavirusisolate beobachtet. Bei 22 °C trat eine Inaktivierung des H3N8-Virus innerhalb von drei Tagen und des H5N6-Virus innerhalb von sieben Tagen auf. Bei 7 °C wurde eine höhere Tenazität für beide Influenzaviren beobachtet. An Tag 17 war kein Infektionsnachweis für das H5N6-Virus mehr möglich.

Somit zeigen beide Isolate die Fähigkeit, ihre Infektiosität in der Rohwurstmatrix für eine gewisse Zeit aufrecht zu erhalten. Ein fortschreitender Verlust der Infektiosität konnte für beide Viren in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit beobachtet werden.

Auch wenn der Unterschied zwischen den Versuchstemperaturen nicht für jeden Versuchstag als statistisch signifikant belegt werden kann, so wird mit Berücksichtigung des reduzierten Versuchsumfanges die Tendenz einer rascheren Inaktivierung bei der Temperatur von 22 °C deutlich.

Aus experimentellen Studien von BROWN *et al.* (2007) und STALLKNECHT *et al.* (1990) sowie SHAHID *et al.* (2009) lässt sich ein Einfluss der Temperatur auf die Tenazität von AIV ableiten. Mit steigender Temperatur nimmt die Geschwindigkeit der Inaktivierung zu. In der Rohwurststudie wurde der Temperatureinfluss ebenfalls beobachtet. Bei 22 °C wurden beide untersuchten Isolate schneller inaktiviert als bei 4 °C.



Der beobachtete Unterschied in der Tenazität des H3N8- und H5N6-Virus bei 22 °C lässt sich in der variablen Stabilität von Influenzavirusisolaten vermuten (siehe 2.3.9). Wie unter anderem die Studien von STALLKNECHT *et al.* (1990a, b) und BROWN *et al.* (2007) zeigten, bestehen deutliche Unterschiede hinsichtlich der Tenazität der einzelnen AIV-Isolate, wobei HPAI-Isolate nicht zwingend eine höhere Stabilität aufweisen als LPAI-Isolate. Die Ursachen für die Heterogenität von Influenza A-Viren hinsichtlich ihrer Tenazität sind weitgehend unbekannt.

Durch Prüfung weiterer Isolate kann die Aussagekraft der durchgeführten Versuchsreihen weiterhin erhöht werden.

Anders als bei den ECHO-Viren spielt für Influenzaviren der pH-Wert in der Rohwurst eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung. Die ermittelten pH-Werte in kurzgereifter Rohwurst liegen in einem für Influenza-Viren kritischen Bereich von pH 5,5 - 5,0. Dabei entsprechen sich die pH-Werte beider Temperaturen an den Tagen drei beziehungsweise sieben, an denen der Infektionsverlust bei 22 °C beobachtet wurde. Neben der Wirkung des pH-Effektes kann ein zusätzlich inaktivierender Einfluss durch die D/L-Milchsäure selbst vermutet werden.

Dass Natriumchlorid in steigenden Konzentrationen einen Einfluss auf die Tenazität von aviären Influenzaviren ausübt, wurde ebenfalls in Studien von BROWN *et al.* (2007) und STALLKNECHT *et al.* (1990a, b) als auch in den eigenen Untersuchungen beobachtet. Daher ist ein Einfluss von Salzgehalten zwischen 2 % und 3 % in Rohwürsten auf die Inaktivierung der Viren durchaus anzunehmen.

Ein zusätzlicher Einfluss von Nitrit wurde *in vitro* nicht überprüft. Eine Wirkung von Nitrit in Rohwurst kann daher gegenüber AIV nicht beurteilt werden.

Ein Einfluss des  $a_w$ -Werts in kurzgereifter Rohwurst ist aufgrund der fehlenden Abtrocknung beziehungsweise Konstanz des Werts eher nicht zu vermuten.

Zum Einfluss bakterieller Stoffwechselprodukte beziehungsweise Enzymen oder Bakteriozinen auf die Tenazität von Influenzaviren in Rohwürsten existieren bisher keine gezielten Untersuchungen.

Eine Studie zur Wirkung von pflanzlichen Extrakten auf Influenza A-Virus wurde von CHANTRILL *et al.* 1952 durchgeführt. Es wurden 142 pflanzliche Extrakte auf eine antivirale Wirksamkeit in virusinfizierten Bruteiern untersucht. Dabei erwiesen sich zwölf Substanzen nach Injektion in die Allantoishöhle hemmend auf die Virusreplikation. Keine Wirkung zeigten

die Substanzen allerdings, wenn sie in proteinhaltigen Medien oder in den Dottersack injiziert wurden.

Die antivirale Wirksamkeit wird wahrscheinlich durch Tannine bedingt. Die virusinaktivierende Wirkung von Tanninen gegenüber Influenzaviren konnte von CARSON u. FRISCH (1953) bestätigt werden. Nach Injektion von Tanninsäure und verschiedener Derivate in Bruteier zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Infektiösität der Influenzaviren im Ei.

Über eine mögliche antivirale Wirkung von pflanzlichen Stoffen (z. Bsp. von Gewürzen) beziehungsweise allgemein von Phytozinen in Rohwürsten ist derzeit kaum etwas bekannt.

#### **5.4.9 Schlussfolgerung aus den beobachteten Ergebnissen mit ECHO-Virus**

Für das ECHO-Virus konnte in den Versuchen mit kurz- und langgereiften Rohwürsten eine Reduktion im Virustiter in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit beobachtet werden. Jedoch erfolgt diese Reduktion verhältnismäßig langsam. Innerhalb der beobachteten Zeiträume von 28 Tagen für kurzgereifte beziehungsweise 56 Tagen für langgereifte Rohwürste konnte keine vollständige Inaktivierung der Viren verzeichnet werden. Das verwendete Modellvirus ECHO 1 Farouk zeigt damit eine hohe Tenazität in den untersuchten Rohwurstprodukten.

Diese Ergebnisse zeigen weitgehende Übereinstimmung mit den Beobachtungen einer Studie mit Polio-Virus Typ 1 und ECHO-Virus 6 in Rohwürsten (KANTOR u. POTTER 1975). Nach experimenteller Infektion des Wurstbräts, konnte in den anschließend daraus hergestellten Salami- und Zervelatwürsten eine bemerkenswert hohe Stabilität der beiden Viren über den Reifungsprozess hinweg festgestellt werden. Bei einer Versuchsdauer von 44 beziehungsweise 56 Tagen wurde unter Kühlagerung der Salami bei 4 °C ab Reifetag vier sowohl bei ECHO- als auch Polio-Virus keine Reduktion der Virustiter beschrieben.

In Annahme einer ähnlichen Stabilität anderer Vertreter der Spezies Humaner Enteroviren, sind Enterovirusinfektionen durch den Verzehr von kontaminierten Rohwürsten als potentiell möglich anzusehen. Aus experimentellen Gründen erfolgte der Einsatz einer sehr hohen Virusmenge zur Kontamination der Produkte. Unter praktischen Bedingungen sind derartig hohe Viruskonzentrationen in einer Rohwurst eher nicht zu erwarten. Jedoch ist die minimal infektiöse Dosis zum Auslösen einer Enterovirusinfektion beim Menschen sehr gering. (KOPROWSKI *et al.* 1956, PLOTKIN *et al.* 1959). Daher sind auch geringere Mengen an Viren in Rohwurst als gewisses Infektionsrisiko anzusehen. Ob bei einer geringeren Kontaminationsdosis der Verlauf der Virusinaktivierung analog der in den Versuchen

beobachteten Kinetik folgt, kann anhand dieses Versuchsaufbaus nicht eingehend beurteilt werden.

Ein Eintrag von Enteroviren kann dabei auf sekundärem Weg über infizierte Personen oder aufgrund mangelnder Hygiene im Zeitraum des Herstellungsprozesses erfolgen. Anders als Viren mit zoonotischem Potential treten humane Enteroviren naturgemäß nicht im Fleisch von Tieren auf, welches für die Herstellung von Rohwürsten eingesetzt wird.

In den Versuchsreihen mit Rohwürsten zeigte das ECHO-Virus eine hohe Stabilität. Die beobachtete Inaktivierung erfolgte nur langsam in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit. Die außerordentliche Stabilität der Enteroviren liegt im Aufbau ihres Kapsids begründet. Extreme Bedingungen an Hitze, UV-Strahlung, Chlor oder Säure sind notwendig, um diese Viren zu inaktivieren (NUANUALSUWAN u. CLIVER 2003). Damit erscheinen geeignete Maßnahmen zur gezielten Inaktivierung von Enteroviren in Rohwurstprodukten wenig realisierbar beziehungsweise schlecht praktisch durchführbar. Extreme Säure- oder Salzgehalte können in den Produkten aufgrund sensorischer Qualitäten nicht zur Anwendung gelangen.

Gezielte Maßnahmen zur Inaktivierung von Enteroviren in Rohwurstprodukten erscheinen lediglich über die Wahl der Temperatur/Zeit-Kombinationen möglich. Lange Reife- und Lagerungszeiten sowie hohe Reifetemperaturen begünstigen eine Virusinaktivierung. Das Erreichen einer Erregerfreiheit kann jedoch nicht mit Sicherheit angenommen werden.

Bekanntlich werden die meisten Probleme mit lebensmittelassoziierten Viren durch die Sekundärkontamination der Produkte während deren Zubereitung beziehungsweise Herstellung hervorgerufen (KOOPMANS u. DUIZER 2004). An Enteroviren erkrankte Mitarbeiter können Viren in hohem Maße über Stuhl oder Aerosol ausscheiden und somit mögliche Kontaminationen von Produkten verursachen. Ein Eintrag der Viren in den Rohwurstherstellungsprozess kann durch Einhaltung strikter Hygienemaßnahmen unterbunden werden. Dies betrifft vor sowohl die Personalhygiene als auch die Hygiene im Produktionsbereich. Dabei ist auf eine ausreichend viruzide Wirkung verwendeter Desinfektionsmittel zu achten. Im Zusammenhang mit einer Infektionsgefahr durch Enteroviren ist die Prävention des Erregereintrags als wichtige Maßnahme zu nennen.

#### **5.4.10 Schlussfolgerungen aus den beobachteten Ergebnissen mit Influenzaviren**

Dass ein unbemerkter Eintrag infizierter Geflügelkarkassen in die Lebensmittelkette ein latentes Risiko darstellt, wurde bereits in Kapitel 2.3.8. erörtert. Wird solches Geflügelfleisch

zur Herstellung von Rohwurstprodukten eingesetzt, so kann über ein mögliches Expositionsrisiko für den Verbraucher diskutiert werden.

Als Risikoprodukt sind Sorten von schnellgereiften streichfähigen Rohwürsten (Mettwürsten) in Betracht zu ziehen. Insbesondere dann, wenn unter durchgängiger Kühltemperatur gereift wird. Frische streichfähige Mettwürste werden weder langen Reifungs- und Trocknungsprozessen unterzogen, wie dies beispielsweise bei Salami geschieht, noch wird das Material wie bei Koch- oder Brühwürsten hitzebehandelt. Frische Mettwurst durchläuft lediglich einen Säuerungs- und sehr kurzen Reifungsprozess, die aber nicht ausreichen, eventuell vorhandene gesundheitsschädigende Keime sicher abzutöten (BfR 1997). Diese vorrangig auf pathogene Bakterien bezogene Aussage ist auch in Zusammenhang mit Influenzaviren von Bedeutung. Eine Reifung unter durchgängiger Kühlung hat das Ziel, einem mikrobiellen Verderb vorzubeugen. Gleichzeitig bietet eine solche Schnellreifung günstige Voraussetzungen sowohl für die Persistenz pathogener Bakterien als auch von Viren im Produkt. So vergeht bei frischen Mettwürsten von der Herstellung bis zur Auslieferung in den Handel beziehungsweise Erwerb durch den Verbraucher nur relativ wenig Zeit. Erhaltene Infektiösität von Influenzaviren in Rohwürsten konnte in den durchgeführten Versuchsreihen für begrenzte Zeit beobachtet werden. Unter Kühlung bei 7 °C zeigten beide Influenzaisolate nach 14 Tagen noch erhaltene Infektiösität. Daher erscheint eine Virusexposition des Verbrauchers bei entsprechend schnellgereiften und gekühlten Rohwurstprodukten mit kontaminiertem Geflügelfleisch theoretisch möglich.

In den Versuchsreihen wurde das gesamte Brät experimentell mit einer hohen infektiösen Dosis kontaminiert. Die Herstellung von Geflügelfleischrohwürsten erfolgt in der Regel nicht unter ausschließlicher Verwendung von Geflügelfleisch. Zumeist finden neben Geflügelfleisch auch Schweinefleisch und Speck Anwendung. Bei mit Influenza-Viren infiziertem Geflügel konnten im Muskelfleisch allerdings ebenfalls hohe infektiöse Dosen nachgewiesen werden (siehe 2.3.8). Somit kann eine Kontamination des Rohwurstbräts bei anteiliger Verwendung entsprechenden Geflügelfleisches durchaus hohe infektiöse Dosen erreichen.

In den durchgeführten Versuchsreihen ließ sich eine Beeinflussung der aviären Influenzaviren durch Temperatur, pH-Wert und Salzgehalt feststellen. Wurden die Rohwurstprodukte einer höheren Reifetemperatur unterzogen, so folgte eine schnellere Inaktivierung beider Isolate.

Die Wahl der Temperatur-Zeit Kombination bei der Reifung und Lagerung erscheint somit als wichtiges Instrument einer möglichen Risikominimierung. Ebenfalls wirken die Hürden pH-Wert und Kochsalzkonzentration bei höherer Temperatur effektiver. Mit der Dauer der

Reifezeit nimmt die Infektionsfähigkeit der Influenzaviren ab. In den Versuchen wurde eine hohe Korrelation von Titer und Zeit beobachtet. Längere Reifezeiten können daher zum Senken eines Infektionsrisikos mit den Viren dienen.

Langgereifte Produkte wie beispielsweise Salami sind aufgrund ihrer vergleichsweise langen Reife- und Lagerungszeiten weniger als Risikoprodukte einzustufen. Ausgehend von den Beobachtungen mit kurzgereiften Rohwürsten erscheint eine Inaktivierung von aviären Influenzaviren in der Zeit bis zum Verkauf dieser Produkte im Handel als wahrscheinlich. Auf Versuchsreihen mit langgereiften Rohwürsten wurde daher verzichtet.

Weitere antivirale Effekte gegenüber Influenzaviren, beispielsweise durch den gezielten Einsatz von Starterkulturen oder Gewürzextrakten, bleiben auf eine Nutzbarkeit in der Praxis noch zu prüfen.

Im Zusammenhang mit einer Infektionsgefahr durch aviäre Influenzaviren ist die Prävention des Erregereintrags einerseits als wichtige Maßnahme zu nennen. Durch entsprechende Kontrollmaßnahmen gilt es, den Eintrag infizierter Geflügelschlachtkörper über Importe als auch über die landeseigene Produktion in die Lebensmittelkette zu vermeiden. Zum anderen ist ein Expositionsrisiko durch die Vermeidung der Herstellung von Risikoprodukten in Form von unter Kühlbedingungen schnellgereiften Rohwürsten zu senken.

#### 5.4.11 Temperatureffekt bei Viren

In den durchgeführten Versuchsreihen konnte sowohl für ECHO- als auch aviäre Influenzaviren ein Temperatureffekt beobachtet werden. Bei Raumtemperatur wurde im Vergleich zur Kühltemperatur eine schnellere Inaktivierung beobachtet. In anderen Studien zur Tenazität von Enteroviren und aviären Influenzaviren konnte dieser Temperatureinfluss ebenfalls beobachtet werden (siehe Tabelle 9, 13). Aber auch für andere Viren konnte eine schnellere Inaktivierung bei Raumtemperaturen gezeigt werden.

**Tabelle 45: Übersicht zum Einfluss der Temperatur auf die Tenazität verschiedenen Viren**

Virus	Matrix/ Versuchsbedingungen	Tenazität	Autor
Felines Calicivirus	Seewasser 40 d	Titerreduktion: bei 4 °C: 1-3 log <sub>10</sub> -Stufen bei 20 °C: > 7 log <sub>10</sub> -Stufen	KADOI u. KADOI, 2001
Poliovirus Hepatitis A-Virus	Seewasser 30 d	Titerreduktion: bei 5 °C geringere Reduktion gegenüber 25 °C für beide Viren	BOSCH, 1995
Hepatitis A-Virus	Seewasser 11 d	Titerreduktion: über 90 % Inaktivierung bei 25 °C nach 11 d, keine Inaktivierung bei 4°C	ARNAL <i>et al.</i> , 1998

Fortsetzung Tabelle 45

Rotavirus	Leitungswasser 64 d	Titerreduktion: bei 4 °C keine Reduktion bei 20 °C: 2 log <sub>10</sub> -Stufen	RAPHAEL <i>et al.</i> , 1985
Astrovirus	Papier 90 d	Titerreduktion: bei 4 °C: bis 4,5 log <sub>10</sub> -Stufen bei 20 °C: Inaktivierung binnen 7 d	ABAD <i>et al.</i> , 2001
Felines Calicivirus	Glasdeckel 56 d	Titerreduktion: bei 4 °C: 4,75 log <sub>10</sub> -Stufen bei 37 °C: Inaktivierung nach 1 d	DOULTREE <i>et al.</i> , 1999

Obwohl der Einsatz von Hitze zur Inaktivierung von Mikroorganismen / Viren in der Lebensmittelherstellung und –verarbeitung weithin verbreitet ist, so sind die genauen Mechanismen einer temperaturabhängigen Inaktivierung in gemäßigten Temperaturbereichen für Viren wenig untersucht.

In einer Studie mit Hepatitis A-Virus konnte VOLKIN *et al.* (1997) im Bereich von 40 °C bis 60 °C keine deutliche Veränderung der Integrität des Viruspartikels beobachten. Geringe Veränderungen im Viruskapsid konnten im Bereich von Tryptophan-Aminosäureresten festgestellt werden. Bei 60 bis 62 °C zeigten sich dagegen deutliche Veränderungen im Kapsid, welche auf eine klassische Denaturierung verschiedener viraler Proteine zurückgeführt wurden.

Für Norovirus ähnliche Partikel konnte bis 60 °C kein Effekt auf die quarternäre Struktur beobachtet werden. Erst ab 65 °C traten Veränderungen der Form und Partikelstruktur auf (AUSAR *et al.* 2006).

Nach einer thermischen Inaktivierung von FCV, Polio-Virus und Hepatitis A-Virus bei 37 °C zeigte sich eine erhaltene Schutzfunktion des viralen Kapsids gegenüber RNase. Nach einer Inaktivierung bei 72 °C wurde das virale RNA-Genom enzymatisch angreifbar. Die Alteration viraler Zielstrukturen der thermischen Inaktivierung erscheint somit als temperaturabhängig variabel (NUANULASUWAN u. CLIVER 2003).

In einer Inaktivierungsstudie mit Polio-Virus bei neutralem pH-Wert und gemäßigten Temperaturen (45 °C) konnten keine Konformationsänderungen der viralen Antigenstrukturen beobachtet werden. Die Inaktivierung wurde aufgrund der Hydrolyse der Virus-RNA durch die RNA-Polymerase innerhalb des Viruspartikels (NEWMAN *et al.* 1995) beobachtet. Folglich wurde ein temperaturinduzierter Infektionsverlust bei Picornaviren zum einen auf einer Proteinkomponente, zum anderen auf einer Komponente des RNA- Genoms vermutet. Während niedrige Temperaturen das RNA-Genom verändern beziehungsweise

alterieren, so verursachen hohe Temperaturen Veränderungen am Genom und der Proteinstruktur (ROMBAUT *et al.* 1994, ANDRIES *et al.* 1994).

Nach zwölfstündiger Inkubation bei 37 °C konnten in einem Kapsidprotein eines MKS-Virus chemische Veränderungen mittels IEF (Isoelectric focusing)-Verfahrens festgestellt werden (RAZDAN *et al.* 1996).

Während chemisch strukturelle Veränderungen für pharmazeutisch eingesetzte Proteine für die Zeit der Herstellung und Lagerung gut beschrieben sind, gestaltet sich der Nachweis chemischer Veränderungen wie Oxidation oder Desaminierung als schwierig (VOLKIN *et al.* 1995, 1997).

Eine thermische Inaktivierung viraler Partikel scheint keinem allgemein gültigen Mechanismus von Destrukturierungs- und Abbauprozessen zu folgen. Vielmehr bleibt ein komplexes Geschehen in Abhängigkeit verschiedener Faktoren zu vermuten (AUSAR *et al.* 2006).

So konnte in den eigenen Versuchsreihen in Abhängigkeit des untersuchten Virus ein Einfluss gemäßigter Temperaturen von 20 - 22 °C beobachtet werden. Jedoch bleibt der Mechanismus dieses Effektes wenig geklärt.

#### **5.4.12 Abschließende Betrachtung**

In den durchgeführten Versuchsreihen mit Rohwürsten konnte für das ECHO-Virus als Vertreter der humanen Enteroviren eine hohe Tenazität beobachtet werden, wohingegen die untersuchten Influenzavirusisolate eine deutlich geringere Tenazität in den Produkten zeigten. So konnte in Abhängigkeit von der jeweiligen Art des Virus eine unterschiedliche Inaktivierungskinetik in der Rohwurstmatrix beobachtet werden. Die hohe Tenazität von ECHO-Virus in Verbindung mit der geringen minimal infektiösen Dosis indiziert, dass sich die rohwrustspezifischen Konservierungsfaktoren zur mikrobiellen Stabilisierung gegenüber Enteroviren nicht als effizient erwiesen, um eine effektive Virusinaktivierung zu erzielen. Gegenüber aviären Influenzaviren jedoch zeigten sich die spezifischen Konservierungsfaktoren wie pH-Wert beziehungsweise Milchsäure und Kochsalzgehalt durchaus als wirkungsvoll.

Für das Lebensmittel Rohwurst ist somit das Maß an Einflussnahme über die spezifischen Konservierungsfaktoren beziehungsweise technologischen Maßnahmen auf eine Inaktivierung viraler Erreger von der Art des jeweils betrachteten Virus abhängig.

Als allgemein wirksam scheint sich der beobachtete Temperatureffekt auf Viren zu erweisen. Gegenüber Kühltemperatur zeigte sich bei Raumtemperatur eine schnellere Inaktivierung. Diese Beobachtung konnte sowohl in den eigenen Versuchsreihen als auch in anderen Studien mit unterschiedlichen Viren gemacht werden. Durch die Verwendung höherer Reifetemperaturen erscheint eine gezielte Einflussnahme auf die Inaktivierung von Viren in Rohwurstprodukten in unterschiedlichem Ausmaß möglich. Wie stark sich dieser Temperatureffekt auswirken kann, ist wiederum von der Art des Virus abhängig zu machen.

Aus den erzielten Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragestellungen. So wurde eine antivirale Wirkung durch den gezielten Einsatz von Starterkulturen oder Gewürzen beziehungsweise deren Extrakten in den Versuchsreihen nicht geprüft. Ebenso erfolgte in den *in vitro*-Modellen keine Prüfung kombinierter Effekte (pH-Wert, Salzgehalt, Temperatur) auf die untersuchten Viren. Für Influenza A-Viren wurden neben den zwei aviären Isolaten H3N8 und H5N6 keine weiteren Isolate hinsichtlich ihrer Variabilität in der Tenazität untersucht.



## 6 Zusammenfassung

Juliane Straube

Untersuchungen zur Tenazität und Inaktivierung von ECHO-Viren und aviären Influenzaviren in Rohwürsten

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Juni 2009

100 Seiten, 57 Tabellen, 34 Abbildungen, 203 Literaturstellen, Anhang

Schlüsselwörter: food borne viruses, Rohwurst, ECHO-Virus, Aviäres Influenzavirus, Tenazität, Inaktivierung,

Viren gewinnen als Erreger von Lebensmittelinfektionen zunehmend an Bedeutung. Für das Jahr 2008 registrierte das Robert Koch-Institut in Deutschland über 211 000 Erkrankungen mit Noroviren und über 77 000 Fälle mit Rotavirus. Als Auslöser infektiöser Gastroenteritiden nehmen Viren damit eine führende Position unter den meldepflichtigen Darmerkrankungen ein. Als Infektionsquelle spielen Lebensmittel eine wichtige Rolle. Vor allem Produkte, die zum Rohverzehr bestimmt sind, stehen häufig in Zusammenhang mit lebensmittelassoziierten Virusinfektionen. Dabei sind auch tierische Erzeugnisse wie Rohfleischwaren oder Rohmilchprodukte von Bedeutung.

Rohwürste sind in Verbindung mit bakteriellen Lebensmittelinfektionen als Risikoprodukte bekannt. Zur Infektionsgefahr durch Viren in Rohwurstprodukten existieren bisher wenige Erkenntnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden daher Untersuchungen zur Tenazität und Inaktivierung anhand von ECHO-Virus und aviären Influenzaviren in Rohwürsten durchgeführt. ECHO-Virus wurde als Stellvertreter für die Spezies Humaner Enteroviren gewählt. Vor dem Hintergrund der aktuellen Influenzavirusproblematik wurden zwei niedrigpathogene Geflügelinfluenzaisolate (H3N8 und H5N6) in den Untersuchungen eingesetzt.

Zunächst wurde *in vitro* der Einfluss der rohwurstspezifischen Konservierungsfaktoren Natriumchlorid und Natriumnitrit sowie D/L-Milchsäure auf die Inaktivierung der Viren geprüft. Anschließend erfolgten Versuchsreihen mit kurz- und langgereiften Rohwürsten. Dafür wurden Rohwürste nach praxisüblichen Verfahren hergestellt und experimentell mit Virus

kontaminiert. Der Infektiösitätsnachweis erfolgte jeweils in BGM-Zellkultur für ECHO-Virus beziehungsweise im Brutei für Geflügelinfluenzavirus.

*In vitro* konnte gegenüber ECHO-Viren kein Einfluss von Natriumchlorid in den geprüften Konzentrationen bis 20 % innerhalb von sieben Tagen beobachtet werden. Natriumnitrit zeigte ebenfalls keine Wirkung. In der Versuchsreihe mit D/L-Milchsäure zeigte ECHO-Virus ebenfalls eine hohe Stabilität. Eine signifikante Titerreduktion trat nur bei der höchsten im Versuch verwendeten Milchsäurekonzentration von 0,4 % auf. In den Versuchsreihen mit kurz- und langgereiften Rohwürsten erwies sich ECHO-Virus ebenfalls als sehr stabil. Eine vergleichsweise geringe Virustiterreduktion erfolgte in Abhängigkeit von Zeit und Temperatur. In den langgereiften Rohwürsten war nach 56 Tagen noch infektiöses Virus nachweisbar. Die hohe Tenazität von ECHO-Virus indiziert, dass sich die rohwrustspezifischen Konservierungsfaktoren gegenüber Enteroviren nicht als effizient erwiesen, um eine effektive Virusinaktivierung herbeizuführen. Eine gezielte Einflussnahme auf eine Virusreduktion im Rohwurstprodukt erscheint in begrenztem Maß über die Wahl der Temperatur/ Zeit- Kombination während der Reifung und Lagerung möglich.

Eine zeit-, temperatur- und konzentrationsabhängige Inaktivierung wurde in der Versuchsreihe mit Natriumchlorid für das Influenzavirus H3N8 beobachtet. Nach 10-tägiger Inkubation mit 12 % Natriumchlorid war bei 20 °C kein infektiöses Virus mehr nachzuweisen. In den Versuchsreihen mit D/L-Milchsäure konnte nach einstündiger Exposition mit 0,2 %iger Milchsäure ebenfalls kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen werden. In kurzgereiften Rohwürsten unterlagen beide untersuchten Influenzavirusisolate einer zeit- und temperaturabhängigen Inaktivierung. Bei 22 °C war nach drei Tagen (H3N8) beziehungsweise sieben Tagen (H5N6) kein infektiöses Virus mehr nachweisbar. Dagegen konnte bei 7 °C nach 14 Tagen noch infektiöses Virus detektiert werden. Beide Influenzavirusisolate wiesen in kurzgereiften Rohwürsten somit nur eine begrenzte Tenazität auf. Für den Verbraucher kann im Zusammenhang mit Rohwurstverzehr ein gewisses Expositionsrisiko entstehen, wenn virushaltiges Geflügelfleisch zur Herstellung von unter Kühlung schnellgereifter, frischer Rohwürste verwendet wird. Daher ist die Wahl der Temperatur/Zeit-Kombination bei der Reifung und Lagerung von Rohwurstprodukten als wichtiges Instrument der Risikominimierung anzuführen. Im Allgemeinen ist das Maß an Einflussnahme auf virale Erreger über die spezifischen Konservierungsfaktoren beziehungsweise technologischen Maßnahmen in Rohwurstprodukten von der Art des jeweiligen Virus abhängig. Ein positiver Einfluss auf die Inaktivierung ist durch die Anwendung höherer Reife- und Lagerungstemperaturen zu erwarten.

## 7 Summary

Juliane Straube

Studies on viral persistence and inactivation of echovirus and avian influenza virus in raw fermented sausages

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in June 2009

100 pages, 57 tables, 34 figures, 203 references, appendix

keywords: food borne viruses, raw fermented sausage, echovirus, avian influenza virus, persistence, inactivation

Viruses are increasingly recognized as causative pathogens of food borne illness. In 2008 the Robert Koch-Institute recorded more than 211 000 cases of norovirus infections and over 77 000 cases of rotavirus infections. As causative pathogens of infectious gastroenteritis viruses play a leading role among notifiable enteric diseases. Thereby food is considered as an important source of viral infection. Particularly raw products are frequently involved in food borne-viral transmission. In this respect animal products like raw meat or dairy products are of importance as well.

With regard to food borne illness caused by bacterial pathogens raw fermented sausages are known as risk products. However the risk of viral infection due to the consumption of raw fermented sausage products has hardly been studied. In this study investigations on viral persistence and inactivation kinetics in raw fermented sausages were made using echovirus and avian influenza viruses. Echovirus was used as a surrogate for the species of human enteroviruses. With regard to the current problems with avian influenza virus two low pathogenic isolates (H3N8 and H5N6) were used in the study.

At first the influence of the relevant parameters sodium chloride, sodium nitrite and D/L-lactic acid on viral persistence was tested *in vitro*. Subsequently studies with short and long fermented raw sausages were conducted. Raw sausages were produced according to common terms and conditions and experimentally spiked with each virus during processing. The infectivity of the viruses was determined in Buffalo Green Monkey cells for echovirus and in embryonated chicken eggs for avian influenza virus.

*In vitro* no influence of sodium chloride up to concentrations of 20 % could be observed on persistence of echovirus within a period of 7 days. Also sodium nitrite showed no effect.

In the series of experiments with D/L-lactic acid echovirus showed high stability as well. Significant decline in viral titer was only observed with the highest amount of lactic acid (0.4 %) used in the investigation. In short and long fermented raw sausages echovirus showed high stability. Only slow decrease in viral titer was observed in dependence on temperature and time. After 56 days infectious virus was still detectable in long fermented sausages. The long term survival of echovirus indicates that the relevant preservation methods were not sufficient to achieve effective viral inactivation of enterovirus in raw fermented sausages. Influence on viral inactivation seems only possible by applying appropriate temperature and time during ripening and storage.

An influence of sodium chloride was observed in dependence on time, temperature and concentration on avian influenza virus H3N8. At 20 °C loss of infectivity was observed by day 10 during exposition to 12 % sodium chloride. Loss of infectivity was also observed after one hour exposure to 0.2 % D/L-lactic acid. In short fermented raw sausages both influenza isolates showed inactivation in dependence on time and temperature. At 22 °C no infectious virus was detected by day 3 (H3N8) and 7 (H5N6), respectively. However, at 7 °C infectious virus was detectable by day 14 with a low infectious dose. Both influenza viruses were able to maintain infectivity in raw fermented sausages only for a certain time. The consumption of raw fermented sausages may pose a certain risk for consumers, if contaminated poultry carcasses are used for producing kinds of short fermented raw sausages ripened and stored under cooling only. With regard to avian influenza viruses the choice of temperature and time for ripening and storage of raw fermented sausages is of importance to reduce the risk of infection.

Overall the degree of influence on viral pathogens via the specific preservation factors or technological methods in raw sausages depends on the type of the respective virus. A positive effect on the inactivation of viruses can be expected from the utilization of higher temperatures for ripening and storage.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abad FX, Villena C, Guix S, Caballero S, Pintó RM, Bosch A. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Sep;67(9):3904-7.
- Abdel-Nasser A, Chotpitayasunondh T, Zhancheng G, Hayden FG, Duc Hien N, de Jong MD et al. Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med.* 2008 Jan;358(3):261-73.
- Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 2000 Mai;74(1-2):3-13.
- Alexander DJ, Parsons G, Manvell RJ. Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol.* 1986;15(4):647-62.
- Alexander DJ. *Virus Infections of Birds.* Amsterdam: Elsevier Science Publishers;1993.
- Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem J.* 1961 Nov;81:384-92.
- Andries K, Rombaut B, Dewindt B, Boeyé A. Discrepancy between infectivity and antigenicity stabilization of oral poliovirus vaccine by a capsid-binding compound. *J Virol.* 1994 Mai;68(5):3397-400.
- Antarasena C, Sirimujalin R, Prommuang P, Blacksell SD, Promkuntod N, Prommuang P. Tissue tropism of a Thailand strain of high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas* spp.). *Avian Pathol.* 2006 Jun;35(3):250-3.
- Areechokchai D, Jiraphongsa C, Laosiritaworn Y, Hanshaoworakul W, O'Reilly M. Investigation of avian influenza (H5N1) outbreak in humans-Thailand, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2006 Apr;55 Suppl (1):3-6.
- Arnal C, Crance JM, Gantzer C, Schwartzbrod L, Deloince R, Billaudel S. Persistence of infectious hepatitis A virus and its genome in artificial seawater. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 1998 Sep;201(3):279-84.
- Asaoka N, Tanaka Y, Sakai T, Fujii Y, Ohuchi R, Ohuchi M. Low growth ability of recent influenza clinical isolates in MDCK cells is due to their low receptor binding affinities. *Microbes Infect.* 2006 Feb;8(2):511-9.
- Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS, Middaugh CR. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *J Biol Chem.* 2006 Jul;281(28):19478-88.

- Bagdasaryan GA. Survival of viruses of the enterovirus group (Poliomyelitis, ECHO, Cocksackie) in soil and on vegetables. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1964;120:497-505.
- Beard CW, Brugh M, Johnson DC. Laboratory studies with Pennsylvania avian influenza viruses (H5N2). *Proceedings of the US Animal Health Association*. 1984;88:462-73.
- Beard CW, Brugh M, Webster RG. Emergence of amantadine-resistant H5N2 avian influenza virus during a simulated layer flock treatment program. *Avian Dis*. 1987 Jul-Sep;31(3):533-7.
- Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol*. 1991;119(1-2):37-42.
- Beato MS, Terregino C, Cattoli G, Capua I. Isolation and characterization of an H10N7 avian influenza virus from poultry carcasses smuggled from China into Italy. *Avian Pathology*. 2006;35:400-3.
- Booth, IR, Kroll RG. Mechanisms of action of food preservation procedures. London: Elsevier applied science;1989 .
- Bosch A. The survival of enteric viruses in the water environment. *Microbiol. Sem*. 1995;11:393–396.
- Brown JD, Swayne DE, Cooper RJ, Burns RE, Stallknecht DE. Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Dis*. 2007 Mar;51(1 Suppl):285-9.
- Buchy P, Mardy S, Vong S, Toyoda T, Aubin J, Miller M et al. Influenza A/H5N1 virus infection in humans in Cambodia. *J Clin Virol*. 2007 Jul;39(3):164-8.
- Carson RS, Frisch AW. The inactivation of influenza viruses by tannic acid and related compounds. *J Bacteriol*. 1953 Nov;66(5):572-5.
- Chantrill BH, Coulthard CE, Dickinson L, Inkley GW, Morris W, Pyle AH. The action of plant extracts on a bacteriophage of *Pseudomonas pyocyanea* and on influenza A virus. *J Gen Microbiol*. 1952 Feb;6(1-2):74-84.
- Carter MJ. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J Appl Microbiol*. 2005;98(6):1354-80.
- Castro AE, Lu H, Senne D, Henzler D. Biological and molecular characteristics of the H7N2 subtype of avian influenza virus isolated during a 1997 field outbreak in layer flocks. In: *Proceedings of the 47th Western Poultry Disease Conference*; 1998. p. 69-70.
- Cliver DO. Virus transmission via food. *World Health Statistics quarterly*. 1997; 50(1-2):90-101.
- Cliver DO, Kostenbader KD, Vallenar MR. Stability of viruses in low moisture foods. *Journal of milk and food technology*. 1970;33:484–491.
- Connolly KJ, Hammer SM. The acute aseptic meningitis syndrome. *Infect Dis Clin North Am*. 1990 Dec;4(4):599-622.

- Connor RJ, Kawaoka Y, Webster RG, Paulson JC. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology*. 1994 Nov;205(1):17-23.
- Coretti K. Rohwurstreifung und Fehlerzeugnisse bei der Rohwurstreifung. Alzey: Verlag der rheinhessischen Druckwerkzeuge;1971.
- Coretti K. Rohwurst heute. Herstellung und Lagerung. *Fleischwirtschaft*. 1974;54:170-6.
- Dagan R. Nonpolio enteroviruses and the febrile young infant: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. *Pediatr Infect Dis J*. 1996 Jan;15(1):67-71.
- Dedman D, Laurichesse H, Caul EO, Wall PG. Surveillance of small round structured virus (SRSV) infection in England and Wales, 1990-5. *Epidemiol Infect*. 1998 Aug;121(1):139-49.
- Desselberger U, Iturriza-Gómara M, Gray J. Rotavirus epidemiology and surveillance. In: D. Chadwick & J. Goode (Hrsg.). *Gastroenteritis viruses*. New York: Wiley;2001.p. 82-100.
- Diedrich S, Schreier E. Aseptic meningitis in Germany associated with echovirus type 13. *BMC Infect Dis*. 2001;(1):14.
- Dinh PN, Long HT, Tien NTK, Hien NT, Mai LTQ, Phong LH et al. Risk factors for human infection with avian influenza A H5N1, Vietnam, 2004. *Emerg Infect Dis*. 2006 Dez;12(12):1841-7.
- Doms RW, Helenius A, White J. Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin. The low pH-induced conformational change. *J Biol Chem*. 1985 Mar;260(5):2973-81.
- Doultree JC, Druce JD, Birch CJ, Bowden DS, Marshall JA. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J Hosp Infect*. 1999 Jan;41(1):51-7.
- Eklund K. Was sind sichere Produkte. In: Bundesanstalt für Fleischforschung (Hrsg.). *Sichere Produkte bei Fleisch und Fleischerzeugnissen*. Kulmbach: Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung;1990.p. 62-71.
- Fong T, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005 Jun;69(2):357-71.
- Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SAG, Munster V et al. Avian influenza virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Feb;101(5):1356-61.
- Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*. 2005 Mar;79(5):2814-22.
- Frankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI. Molecular epidemiology of "Norwalk like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *Journal of Infectious Diseases*. 1998;178:1571-80.

Friedrich Loeffler Institut. Protokolle zum Nachweis von Influenza A mittels konventioneller und real- time PCR. 2005 Aug.

Gao P, Watanabe S, Ito T, Goto H, Wells K, McGregor M et al. Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):3184-9.

Garten W, Klenk HD. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol*. 1999 Mar;7(3):99-100.

Geisen R, Lücke FK, Kröckel L. Starter- und Schutzkulturen für Fleisch und Fleischerzeugnisse. In: Bundesanstalt für Fleischforschung (Hrsg.). Sichere Produkte bei Fleisch und Fleischerzeugnissen. Kulmbach: Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung ;1990. p. 91-112.

Gerba CP, Goyal SM. Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: a review. *Journal of food protection*. 1978;41:743–745.

Glaser L, Stevens J, Zamarin D, Wilson IA, García-Sastre A, Tumpey TM et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol*. 2005 Sep;79(17):11533-6.

Glathe H, Strittmatter HU, Kunze M, Sinnecker H. [Effect of low pH values on the infectivity and neuraminidase activity of human and animal strains of influenza virus type A]. *Acta Biol Med Ger*. 1982;41(11):1075-8.

Gregory JB, Litaker RW, Noble RT. Rapid one-step quantitative reverse transcriptase PCR assay with competitive internal positive control for detection of enteroviruses in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jun;72(6):3960-7.

Gulati BR, Nakagomi O, Koshimura Y, Nakagomi T, Pandey R. Relative frequencies of G and P types among rotaviruses from Indian diarrheic cow and buffalo calves. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):2074-6.

Haas B, Ahl R, Böhm R, Strauch D. Inactivation of viruses in liquid manure. *Rev Sci Tech*. 1995 Jun;14(2):435-45.

Harder TC, Teuffert J, Starick E, Gethmann J, Grund C, Fereidouni S et al. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in frozen duck carcasses, Germany, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2009 Feb;15(2):272-9.

Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP. The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 Dez;356(1416):1861-70.

Hechelmann H, Kasprowiak M. Mikrobiologische Kriterien für stabile Produkte . *Fleischwirtschaft*. 1991;71:374-89.

Herrler G, Klenk HD. Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus. *Adv Virus Res*. 1991;40:213-34.



- Herzig R, Patt CM, Prokes T. An uncommon severe clinical course of European tick-borne encephalitis. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2002 Dez;146(2):63-7.
- Hildebrandt G. Chemische Verfahren. In: Sinell H J (Hrsg.). Einführung in die Lebensmittelhygiene. Stuttgart: Parey Verlag ;2004. p. 172 -196.
- Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clin Microbiol Rev. 2001 Jan;14(1):129-49.
- Horimoto T, Nakayama K, Smeekens SP, Kawaoka Y. Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. J Virol. 1994 Sep;68(9):6074-8.
- Hurst CJ, Benton WH, McClellan KA. Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. Can J Microbiol. 1989 Apr;35(4):474-80.
- Isbarn S, Buckow R, Himmelreich A, Lehmacher A, Heinz V. Inactivation of avian influenza virus by heat and high hydrostatic pressure. J Food Prot. 2007 Mar;70(3):667-73.
- Jezyna C, Zajac W, Ciesielski T, Pancewicz S. [Epidemiologic and clinical studies of patients with tick-borne encephalitis from northeastern Poland]. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]. 1984 Jan;178(5-6):510-21.
- Johne R, Nöckler K, Kaci S. Hepatitis E – a foodborne viral zoonosis in Germany ?. Archiv für Lebensmittelhygiene 59. 2008;2:44-8.
- Kaci S, Nöckler K, Johne R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. Vet Microbiol. 2008 Apr;128(3-4):380-5.
- Kadoi K, Kadoi BK. Stability of feline caliciviruses in marine water maintained at different temperatures. New Microbiol. 2001 Jan;24(1):17-21.
- Kandun IN, Wibisono H, Sedyaningsih ER, Yusharmen, Hadisoedarsuno W, Purba W et al. Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. N Engl J Med. 2006 Nov;355(21):2186-94.
- Kantor MA, Potter NN. Persistence of Echovirus and Poliovirus in Fermented Sausages - Effects of Sodium Nitrite and Processing Variables. Journal of Food Science. 1975;40:968-72.
- Klenk HD, Rott R, Orlich M, Blödorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. Virology. 1975 Dez;68(2):426-39.
- Klenk HD, Matrosovich M, Stech J. Animal Viruses - Molecular Biology. Caister Academic Press;2008.
- Konowalchuk J, Speirs JI. Virus inactivation by grapes and wines. Appl Environ Microbiol. 1976 Dez;32(6):757-63.
- Konowalchuk J, Speirs JI. Antiviral effect of commercial juices and beverages. Appl Environ Microbiol. 1978 Jun;35(6):1219-20.

- Konowalchuk J, Speirs JI. Antiviral effect of apple beverages. *Appl Environ Microbiol.* 1978 Dez;36(6):798-801.
- Konowalchuk J, Speirs JI. Survival of enteric viruses on fresh fruit. *Journal of milk and food technology.* 1975;38:598–600.
- Konowalchuk J, Speirs JI. Survival of enteric viruses on fresh vegetables. *Journal of milk and food technology.* 1975;38:469–472.
- Koopmans M, Duizer E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int J Food Microbiol.* 2004 Jan;90(1):23-41.
- Koopmans M, von Bonsdorff CH, Vinjé J, de Medici D, Monroe S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 2002 Jun;26(2):187-205.
- Koopmans M, Wilbrink B, Conyn M, Natrop G, van der Nat H, Venemaa H et al. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 2004 Feb;363(9409):587-93.
- Koprowski H, Norton TW, Jervis GA, Nelson TL, Chadwick DL, Nelsen DJ et al. Clinical investigations on attenuated strains of poliomyelitis virus; use as a method of immunization of children with living virus. *J Am Med Assoc.* 1956 Mar;160(11):954-66.
- Kreth HW. Enterovirusinfektionen. In: Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (Hrsg.). *DGPI- Handbuch.* München: Futuramed Verlag;1997. p.255-58.
- Kurtz J, Manvell RJ, Banks J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. *Lancet.* 1996 Sep;348(9031):901-2.
- Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie.* 1931;162:480-3.
- Lang G, Rouse BT, Narayan O, Ferguson AE. A new influenza virus infection in turkeys. *Can. Vet. J.* 1968;(9):22-9.
- Lazarowitz SG, Choppin PW. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology.* 1975 Dec;68(2):440-54.
- Lee ST, Ki C, Lee SYN. Molecular characterization of enteroviruses isolated from patients with aseptic meningitis in Korea, 2005. *Archives in Virology.* 2007;152:963–70.
- Leistner, L. Allgemeines über Rohwurst und Rohschinken. In: Bundesanstalt für Fleischforschung (Hrsg.). *Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken.* Kulmbach: Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung;1985. p. 1-29.
- Leistner L. Allgemeines über Rohwurst. *Fleischwirtsch.* 1986;66:290-00.
- Lopman BA, Reacher MH, Duijnhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral Gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995- 2000. *Emerg Infect Dis.* 2003 Jan;9(1):90-96.

Lu H, Castro AE, Pennick K, Liu J, Yang Q, Dunn P et al. Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Dis.* 2003 ;47(3 Suppl):1015-21.

Lucchelli A, Kang SY, Jayasekera MK, Parwani AV, Zeman DH, Saif LJ. A survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. *J Vet Diagn Invest.* 1994 Apr;6(2):175-81.

Lücke FK. Mikrobiologische Vorgänge bei der Herstellung von Rohwurst . In: Bundesanstalt für Fleischforschung (Hrsg.). *Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken.* Kulmbach: Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung;1985. p. 85-96 .

Lücke FK, Hechelmann H. Starterkulturen für Rohwurst und Rohschinken. In: Bundesanstalt für Fleischforschung, (Hrsg.). *Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken.* Kulmbach: Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung;1985. p. 193- 199.

Mase M, Eto M, Tanimura N, Imai K, Tsukamoto K, Horimoto T et al. Isolation of a genotypically unique H5N1 influenza virus from duck meat imported into Japan from China. *Virology.* 2005 Aug;339(1):101-9.

Matrosovich M, Tuzikov A, Bovin N, Gambaryan A, Klimov A, Castrucci MR et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol.* 2000 Sep;74(18):8502-12.

Mattison K, Anu S, Cook A, Pollari F, Friendship R. Human Noroviruses in Swine and Cattle. *Emerging Infectious Diseases.* 2007;13(8):1184-8.

Mbithi JN, Springthorpe VS, Sattar SA. Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 1991 Mai;57(5):1394-9.

McCarthy PL, Klig JE, Kennedy WP, Kahn JS. Fever without apparent source on clinical examination, lower respiratory infections in children, and enterovirus infections. *Curr Opin Pediatr.* 2000 Feb;12(1):77-95.

Mead P, Slutsker L, Griffin P, Tauxe R. Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg. *Emerg Infect Dis.* 1999 Nov;5(6):841-2.

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep;94(18):9860-5.

Mittal A, Shangguan T, Bentz J. Measuring pKa of activation and pKi of inactivation for influenza hemagglutinin from kinetics of membrane fusion of virions and of HA expressing cells. *Biophys J.* 2002 Nov;83(5):2652-66.

Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie.* 2.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag;2003.

Murphy BR, Hinshaw VS, Sly DL, London WT, Hosier NT, Wood FT et al. Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. *Infect Immun.* 1982 Sep;37(3):1119-26.

- Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe BN, Howles PM, Chankog RM, Melnick JL, Monath TP et al.(Hrsg.). Fields virology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 459-68.
- Müller H, Johne R. Rotaviruses: diversity and zoonotic potential-a brief review. Berl Munch Tierärztl Wochenschr. 2007 Mar-Apr;120(3-4):108-12.
- Naeve CW, Hinshaw VS, Webster RG. Mutations in the hemagglutinin receptor-binding site can change the biological properties of an influenza virus. J Virol. 1984 Aug;51(2):567-9.
- Nakagomi O, Mochizuki M, Aboudy Y, Shif I, Silberstein I, Nakagomi T. Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. J Clin Microbiol. 1992 Apr;30(4):1011-3.
- Nakagomi T, Nakagomi O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. J Virol. 1989 Mar;63(3):1431-4.
- Newman JF, Tirrell S, Ullman C, Piatti PG, Brown F. Stabilising oral poliovaccine at high ambient temperatures. Vaccine. 1995;13(15):1431-5.
- Nicolosi A, Hauser WA, Beghi E, Kurland LT. Epidemiology of central nervous system infections in Olmsted County, Minnesota, 1950-1981. J Infect Dis. 1986 Sep;154(3):399-408.
- Nuanualsuwan S, Cliver DO. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):350-7.
- Oliver SL, Dastjerdi AM, Wong S, El-Attar L, Gallimore C, Brown DWG et al. Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans. J Virol. 2003 Feb;77(4):2789-98.
- Oner AF, Bay A, Arslan S, Akdeniz H, Sahin HA, Cesur Y et al. Avian influenza A (H5N1) infection in eastern Turkey in 2006. N Engl J Med. 2006 Nov;355(21):2179-85.
- Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and other enteroviruses In: Knipe BN, Howles PM, Chankog RM, Melnick JL, Monath TP et al.(Hrsg.). Fields virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 723-75.
- Palmer DF, Coleman MT, Dowdle WR, Schild GC. Advanced Laboratory Techniques for Influenza Diagnosis. Procedural Guide. Immunology Series No. 6. Atlanta: U.S. Dept. of Health, Education and Welfare; 1975.
- Plotkin SA, Koprowski H, Stokes JJ. Clinical trials in infants of orally administered attenuated poliomyelitis viruses. Pediatrics. 1959 Jun;23(6):1041-62.
- Peiris M, Yuen KY, Leung CW, Chan KH, Ip PL, Lai RW et al. Human infection with influenza H9N2. Lancet. 1999 Sep;354(9182):916-7.
- Puri A, Booy FP, Doms RW, White JM, Blumenthal R. Conformational changes and fusion activity of influenza virus hemagglutinin of the H2 and H3 subtypes: effects of acid pretreatment. J Virol. 1990 Aug;64(8):3824-32.
- Raphael RA, Sattar SA, Springthorpe VS. Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water. Can J Microbiol. 1985 Feb;31(2):124-8.

- Razdan R, Sen AK, Rao BV, Suryanarayana VV. Stability of foot-and-mouth disease virus, its genome and proteins at 37 degrees C. *Acta Virol.* 1996 Feb;40(1):9-14.
- Reed LJ, Muench LH. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938 Mai;27(3):493-97.
- Rimmelzwaan GF, van Riel D, Baars M, Bestebroer TM, van Amerongen G, Fouchier RAM et al. Influenza A virus (H5N1) infection in cats causes systemic disease with potential novel routes of virus spread within and between hosts. *Am J Pathol.* 2006 Jan;168(1):176-83.
- Rodger SM, Schnagl RD, Holmes IH. Further biochemical characterization, including the detection of surface glycoproteins, of human, calf, and simian rotaviruses. *J Virol.* 1977 Okt;24(1):91-8.
- Rogers GN, Paulson JC, Daniels RS, Skehel JJ, Wilson IA, Wiley DC. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature.* 1983 Jul;304(5921):76-8.
- Rombaut B, Verheyden B, Andries K, Boeyé A. Thermal inactivation of oral polio vaccine: contribution of RNA and protein inactivation. *J Virol.* 1994 Okt;68(10):6454-7.
- Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis.* 1995 Apr;20(4):971-81.
- Rott R. The pathogenic determinant of influenza virus. *Vet Microbiol.* 1992 Nov;33(1-4):303-10.
- Rödel W. Rohwurstreifung. In: Bundesanstalt für Fleischforschung, (Hrsg.). *Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Rohschinken.* Kulmbach: Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung;1985.p. 60-72.
- Rusin P, Enriquez C, Johnson D, Gerba CP. Environmentally transmitted pathogens. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (Hrsg.). *Environmental microbiology.* San Diego: Academic Press. 2000. p. 473-84.
- Salo RJ, Cliver DO. Effect of acid pH, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Arch Virol.* 1976;52(4):269-82.
- Salo RJ, Cliver DO. Inactivation of enteroviruses by ascorbic acid and sodium bisulfite. *Appl Environ Microbiol.* 1978 Jul;36(1):68-75.
- Santos N, Lima RC, Nozawa CM, Linhares RE, Gouvea V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. *J Clin Microbiol.* 1999 Aug;37(8):2734-6.
- Sato SB, Kawaski K, Ohnishi S. Hemolytic activity of influenza virus hemagglutinin glycoproteins activated in mildly acidic environments. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;80:3153-7.

Sattar SA, Dimock KD, Ansari SA, Springthorpe VS. Spread of acute hemorrhagic conjunctivitis due to enterovirus-70: effect of air temperature and relative humidity on virus survival on fomites. *J Med Virol.* 1988 Jul;25(3):289-96.

Sattar SA, Lloyd-Evans N, Springthorpe VS, Nair RC. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J Hyg (Lond).* 1986 Apr;96(2):277-89.

Sawyer MH. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2002 Jan;13(1):40-7.

Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine.* 1985 Sep;3(3 Suppl):215-8.

Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses to treatment at low pH and heating. *Arch Virol.* 1985;85(1-2):1-11.

Sedyaningsih ER, Isfandari S, Setiawaty V, Rifati L, Harun S, Purba W et al. Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. *J Infect Dis.* 2007 Aug;196(4):522-7.

Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Süß J, Lipkind M et al. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis.* 1996 Apr-Jun;40(2):425-37.

Shahid MA, Abubakar M, Hameed S, Hassan S. Avian influenza virus (H5N1); effects of physico-chemical factors on its survival. *Virol J.* 2009;6:38.

Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000;69:531-69.

Songserm T, Amonsin A, Jam-on R, Sae-Heng N, Pariyothorn N, Payungporn S et al. Fatal avian influenza A H5N1 in a dog. *Emerg Infect Dis.* 2006 Nov;12(11):1744-7.

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3256-60.

Spackman E. *Avian Influenza Virus.* US Department of Agriculture, Athens. Humana Press; 2008.

Spearman C. The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without Gauss's formulae. *British Journal of Psychology.* 1908;2:227-42.

Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 1990 Apr-Jun;34(2):412-8. [a]

Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 1990 Apr-Jun;34(2):406-11. [b]

Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, King AM et al. *Familiy Picornaviridae.* In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball EA (Hrsg.). *Virus taxonomy.*

Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier Academic Press. 2005. p: 757-78.

Stegmann T, Booy FP, Wilschut J. Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin. *J Biol Chem*. 1987 Dez;262(36):17744-9.

Stiebing, A..Rohwurst. In: W. Brandscheid, K. O. Honikel, G. Lengerken & K. Troeger (Eds.). *Qualität von Fleisch und Fleischwaren*. Frankfurt am Main: Deutscher Fachverlag GmbH;1998. p. 875-894.

Stuart-Harris, C. H. & Schild, G.C. *Influenza, The Viruses and the Disease*. The molecular virology and replication of influenza viruses. Littleton: Publishing Science Group;1976.

Suarez DL, Schultz-Cherry S. Immunology of avian influenza virus: a review. *Development and Comparative Immunology*. 2000;24:269–83.

Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol*. 1998;143(6):1215-21.

Sullivan R, Fassolitis A, Read RB. Method for isolating viruses from ground beef. *Journal of Food science*. 1970;35:624.

Swayne DE, Beck JR. Experimental study to determine if low-pathogenicity and high-pathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation. *Avian Dis*. 2005 Mar;49(1):81-5.

Swayne D E, Halvorson DA. Influenza. In: Saif MY, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson LR, Swayne DE (Hrsg.). *Diseases of Poultry*. 11. Auflage. Ames, IA: Iowa State University Press; 2003. p. 135-60.

Takao S, Komazawa Y, Fukuda S, Shimazu Y, Noda M, Tokumoto S. Duration of echovirus 30 excretion in stools from patients with aseptic meningitis. *Jpn J Infect Dis*. 2000 Jun;53(3):132-3.

Thiry E, Zicola A, Addie D, Egberink H, Hartmann K, Lutz H et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in cats and other carnivores. *Vet Microbiol*. 2007 Mai;122(1-2):25-31.

Thomas C, King DJ, Swayne DE. Thermal inactivation of avian influenza and Newcastle disease viruses in chicken meat. *J Food Prot*. 2008 Jun;71(6):1214-22.

Tiron SV. Field and laboratory studies related to the persistence, survival and inactivation of enteroviruses in some foods. 1992;1:298–303.

Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LEL, Senne DA, Lee J, Lee Y et al. Characterization of a highly pathogenic H5N1 avian influenza A virus isolated from duck meat. *J Virol*. 2002 Jun;76(12):6344-55.

Tweed SA, Skowronski DM, David ST, Larder A, Petric M, Lees W et al. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis*. 2004 Dec;10(12):2196-9.

- Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell SF, Kitphati R, Auwanit W, Puthavathana P et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med*. 2005 Jan;352(4):333-40.
- Van Deusen RA, Hinshaw VS, Senne DA, Pellacani D. Micro neuraminidase-inhibition assay for classification of influenza A virus neuraminidases. *Avian Dis*. 1983 Jul-Sep;27(3):745-50.
- Vey M, Orlich M, Adler S, Klenk HD, Rott R, Garten W. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology*. 1992 Mai;188(1):408-13.
- Vines A, Wells K, Matrosovich M, Castrucci MR, Ito T, Kawaoka Y. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol*. 1998 Sep;72(9):7626-31.
- Volkin DB, Mach H, Middaugh CR. Degrading covalent reactions important to protein stability. *Methods Mol Biol*. 1995;40:35-63
- Volkin DB, Burke CJ, Marfia KE, Oswald CB, Wolanski B, Middaugh CR. Size and conformational stability of the hepatitis A virus used to prepare VAQTA, a highly purified inactivated vaccine. *J Pharm Sci*. 1997 Jun;86(6):666-73.
- Wang Q, Han MG, Cheetham S, Souza M, Funk JA, Saif LJ. Porcine noroviruses related to human noroviruses. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dez;11(12):1874-81.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992 Mar;56(1):152-79.
- Webster RG, Kawaoka Y. Avian influenza. *CRC Crit Rev Poult. Biol*. 1988;1:211-46.
- Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*. 1978 Feb;84(2):268-78.
- Weiss C, Clark HF. Rapid inactivation of rotaviruses by exposure to acid buffer or acidic gastric juice. *J Gen Virol*. 1985 Dez;66 (12):2725-30.
- White J, Kartenbeck J, Helenius A. Membrane fusion activity of influenza virus. *EMBO J*. 1982;1(2):217-22.
- Wilke K. Wurstwaren. In: Fehlehaber K, Janetschke P (Hrsg.). *Veterinärmedizinische Lebensmittelhygiene*. Jena: Gustav Fischer Verlag;1992. p. 302 -28.
- Winiarczyk S, Paul PS, Mummidi S, Panek R, Gradzki Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2002 Oct;49(8):373-8.
- Wirth F. Nitrit und Nitrat in erhitzten und rohen Fleischerzeugnissen. *Fleischerei*. 1980;21:21-4.
- Wood GW, Adams MR. Effects of acidification, bacterial fermentation and temperature on the survival of rotavirus in a model weaning food. *Journal of Food Protection*. 1992;55:52-5.



Wood GW, McCauley JW, Bashiruddin JB, Alexander DJ. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. Arch Virol. 1993;130(1-2):209-17.

Zitzow LA, Rowe T, Morken T, Shieh W, Zaki S, Katz JM. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. J Virol. 2002 May;76(9):4420-9.

van Der Poel WH, Vinjé J, van Der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MP. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. Emerg Infect Dis. 2000 Jan-Feb;6(1):36-41.

## **Gesetze**

Lebensmittel-, Futtermittel- und Bedarfsgegenständegesetzbuch (LFGB)  
vom 1. September 2005  
Bundesgesetzblatt I, 2618 (3007)

Das Deutsche Lebensmittelbuch  
Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse  
in der Fassung der Bekanntmachung vom 23.1.2003  
BAnz. Nr. 89 vom 18.06.2008

## **Internetquellen**

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). 2008 (zitiert vom 03.05. 2009)  
Verbrauchertipps: Schutz vor lebensmittelbedingten Infektionen mit Listerien  
<[http://www.bfr.bund.de/cm/238/verbrauchertipps\\_schutz\\_vor\\_lebensmittelbedingten\\_infektionen\\_mit\\_listerien.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/238/verbrauchertipps_schutz_vor_lebensmittelbedingten_infektionen_mit_listerien.pdf)>

Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). 2009 (zitiert vom 02.06. 2009)  
BELA-Handbuch zu den Dokumentationsbögen, Stand 2009  
<[http://www.bfr.bund.de/cm/208/bela\\_handbuch\\_zu\\_den\\_dokumentationsboegen.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/208/bela_handbuch_zu_den_dokumentationsboegen.pdf)>

Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA). 2008 (zitiert vom 2.6.2009)  
Zoonoses country report Germany 2006  
<[http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Report\\_2006\\_Germany.pdf](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Report_2006_Germany.pdf).  
ssbinary=true>

Friedrich Löffler Institut (FLI). 2006 (zitiert vom 10.01. 2009)  
Epidemiologisches Bulletin Nr. 37/ 2006 vom 03.07. 2006  
<[http://www.fli.bund.de/fileadmin/user\\_upload/Dokumente/News/aktuelle\\_Krankheitsgeschehen/avi\\_Flu/LB\\_Influenza060703.pdf](http://www.fli.bund.de/fileadmin/user_upload/Dokumente/News/aktuelle_Krankheitsgeschehen/avi_Flu/LB_Influenza060703.pdf)>

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2002 (zitiert vom 20.01. 2009)  
Enterovirusklassifizierung  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>

Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (NLGA). 2006 (zitiert vom 10.01. 2009)  
Enterovirussurveillance  
<[http://www.nlga.niedersachsen.de/master/C16393298\\_N14376991\\_L20\\_D0\\_I5800417.html](http://www.nlga.niedersachsen.de/master/C16393298_N14376991_L20_D0_I5800417.html)>

Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES). 2008 (zitiert vom 10.04. 2009)

Lebensmittelwarnungen

<<http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/lebensmittelwarnsysteme/lebensmittelwarnungen/14-mai-2008-ages-warnung-vor-rohwurst/>>

Robert Koch Institut. 2002 (zitiert vom 20.01. 2009 )

Übersicht zu Erkrankungen durch Enteroviren.

<[http://www.rki.de/cln\\_091/nn\\_467486/DE/Content/InfAZ/E/Enteroviren/Uebersicht\\_\\_Enteroviren.html](http://www.rki.de/cln_091/nn_467486/DE/Content/InfAZ/E/Enteroviren/Uebersicht__Enteroviren.html)>

Robert Koch Institut. 2007 (zitiert vom 05.04. 2009)

Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2007

<[http://www.rki.de/cln\\_091/nn\\_197444/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2007.html?nnn=true](http://www.rki.de/cln_091/nn_197444/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch2007.html?nnn=true)>

Robert Koch Institut. 2007 (zitiert vom 05.06. 2009)

Epidemiologisches Bulletin vom 19. Januar 2009 (3/2009)

<[http://www.rki.de/cln\\_091/nn\\_1378492/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/03\\_09,templated=raw,property=publicationFile.pdf/03\\_09.pdf](http://www.rki.de/cln_091/nn_1378492/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2009/03_09,templated=raw,property=publicationFile.pdf/03_09.pdf)>

Robert Koch Institut. 2007 (zitiert vom 05.06. 2009)

Epidemiologisches Bulletin vom 18. Januar 2008 (3/2008)

<[http://www.rki.de/cln\\_091/nn\\_969736/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2008/03\\_08,templated=raw,property=publicationFile.pdf/03\\_08.pdf](http://www.rki.de/cln_091/nn_969736/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2008/03_08,templated=raw,property=publicationFile.pdf/03_08.pdf)>

World Health Organisation for Animal Health (FAO). 2002 (zitiert vom 03.05. 2009)

A Basic Laboratory Manual for the Small-Scale Production and Testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine

<<http://www.fao.org/DOCREP/005/AC802E/ac802e0f.htm#TopOfPage>>

World Health Organisation for Animal Health (OIE). 2008 (zitiert vom 03.05. 2009)

Avian Influenza: Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2008

<[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04\\_AI.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf)>

World Health Organistaion (WHO). 2009 (zitiert vom 03.05. 2009)

H5N1 avian influenza: Timeline of major events.

<[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/Timeline\\_09\\_03\\_23.pdf](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/Timeline_09_03_23.pdf)>

World Health Organistaion (WHO). 2007 (zitiert vom 03.05. 2009)

Avian influenza: food safety issues.

<<http://www.who.int/foodsafety/micro/avian/en/index1.html#handling>>

World Health Organistaion (WHO). 2002 (zitiert vom 30.04. 2009)

Fact sheet Enteroviruses- non Polio.

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs174/en/index.html>>

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Juliane Straube  
Brandvorwerkstrasse 7  
04275 Leipzig  
Straube@vmf.uni-leipzig.de

Geburtsdatum 06.07.1981  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch

### Schulausbildung

1988 – 1992 Grundschule Albrecht Dürer, Freiberg  
1992 – 2000 Gymnasium Geschwister Scholl, Freiberg mit Abschluss Abitur im Juli 2000

### Studium

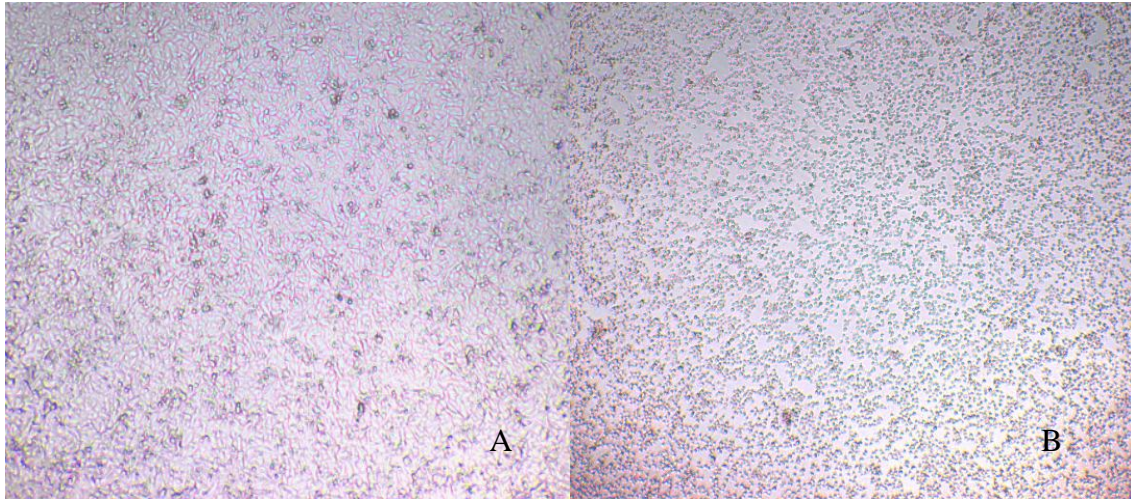
09/ 2000 Studium der Germanistik und Kommunikationswissenschaften, Magister,  
Universität Leipzig  
09/ 2001 Wechsel zur Fachrichtung Veterinärmedizin, Staatsexamen, Universität Leipzig  
Abschluss des Veterinärmedizinstudiums mit Staatsexamen im März 2007

### Berufstätigkeit

04/ 2007 Aufnahme der Promotion am Institut für Tierhygiene und Öffentlichem  
Veterinärwesen, Universität Leipzig  
05/ 2007 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierhygiene und Öffentlichem  
Veterinärwesen, Mitarbeit am Institut und Durchführung der Promotion

Leipzig, den 15.06. 2009

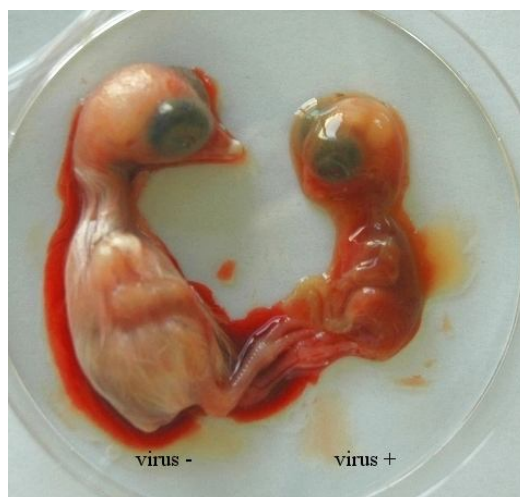
## Anhang



**Abbildung 25: BGM- Zellkultur**

Die Abbildung zeigt die BGM-Zellen nach 4 Tagen Inkubationszeit.

Abb. A: intakter Zellverband, Abb. B: cpe hervorgerufen durch ECHO-Virus

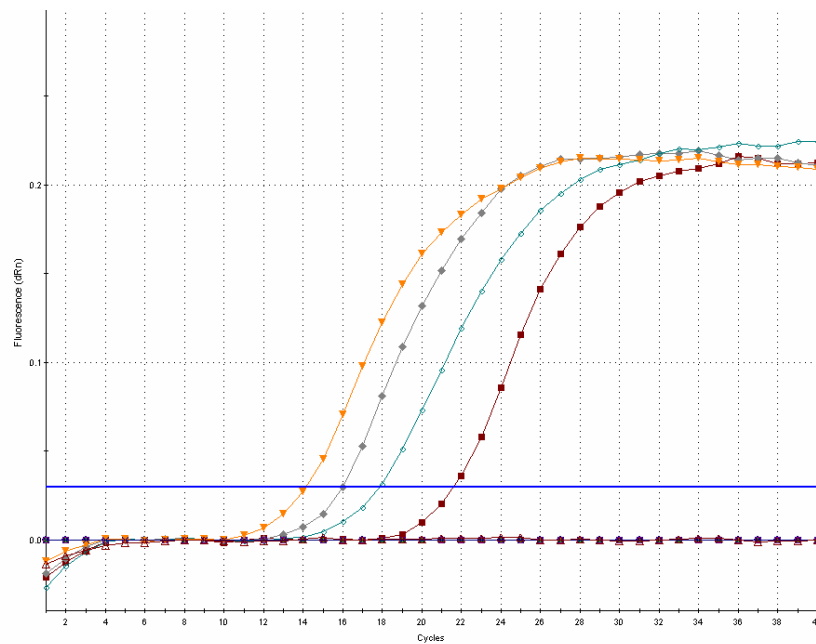


**Abbildung 26: Makroskopische Besichtigung von Hühnerembryonen aus mit Influenzavirus infizierten Bruteiern**

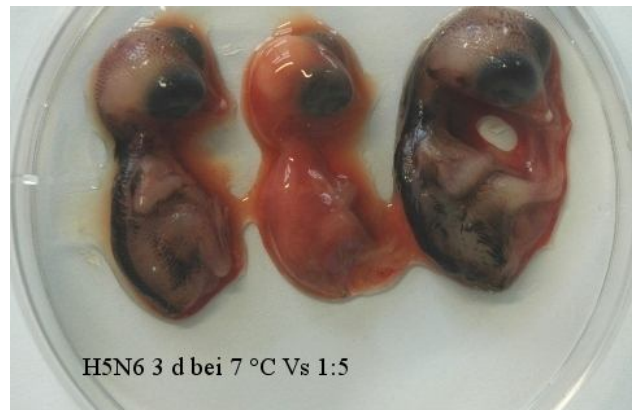
Dargestellt sind ein Virus-negativer und ein Virus-positiver Befund.

**Tabelle 46: Auswertung der Befunde der infizierten Bruteier**

Makroskopischer Befund Embryo: Positivbefund	Makroskopischer Befund Embryo: Negativbefund
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Embryonen deutlich kleiner als Negativkontrollen (Größe, Gewicht)</li> <li>- Entwicklungsstatus entspricht etwa Beimpfungstag (Tag 10 / 11)</li> <li>- Kein Flaum oder nur leichte Flaumansätze</li> <li>- Hämorrhagien der Haut</li> <li>- Anzeichen von Lysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- deutlich größer (Körpergröße, Gewicht)</li> <li>- weiter entwickelt (vollständige Flaumausbildung am ganzen Körper, Entwicklung Krallen, Schnabel)</li> <li>- blassrosa Hautfarbe</li> </ul>
<b>Bewertung immer in Verbindung mittels Virusnachweis im HA-Test (Nachweis in Allantoisflüssigkeit)</b> (Exemplarisch erfolgte der Virusnachweis von Influenza A-Virus auch aus Allantoisflüssigkeit mittels real time RT-PCR.)	



**Abbildung 27: Exemplarischer Nachweis von Influenza A-Virus in Allantoisflüssigkeit infizierter Bruteier aus den Versuchsreihen mit dem H3N8- Virus – Amplifikationskurven der real time RT-PCR**



**Abbildung 28: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühnerembryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten**

Dargestellt ist der Nachweis von infektiösem Influenzavirus aus einer Rohwurstprobe nach 3 Tagen Reifung und Lagerung bei 7 °C. Die Infektion der Bruteier erfolgte mit der Verdünnungsstufe (Vs) von 1:5. Die Embryonen waren Virus-positiv im HA-Test.



**Abbildung 29: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühnerembryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten**

Dargestellt ist der Nachweis von infektiösem Influenzavirus aus einer Rohwurstprobe nach 3 Tagen Reifung und Lagerung bei 22 °C. Die Infektion der Bruteier erfolgte mit der Verdünnungsstufe (Vs) von 1:5. Ein Embryo war Virus-positiv, ein Embryo virus-negativ im HA-Test.



**Abbildung 30: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühnerembryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten**

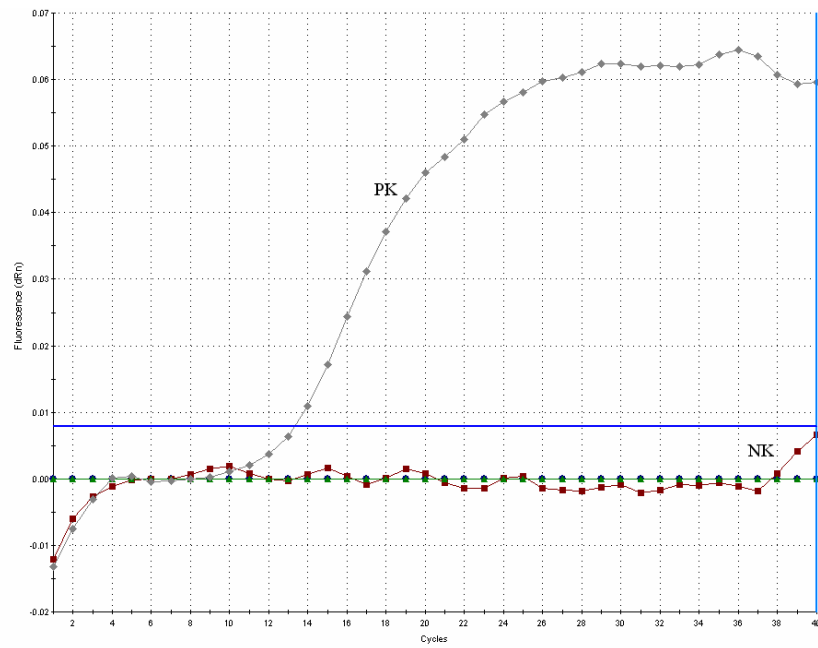
Dargestellt ist der Nachweis von infektiösem Influenzavirus aus einer Rohwurstprobe nach 7 Tagen Reifung und Lagerung bei 7 °C. Die Infektion der Bruteier erfolgte mit der Verdünnungsstufe (Vs) von 1:5. Die Embryonen waren Virus-positiv im HA-Test.



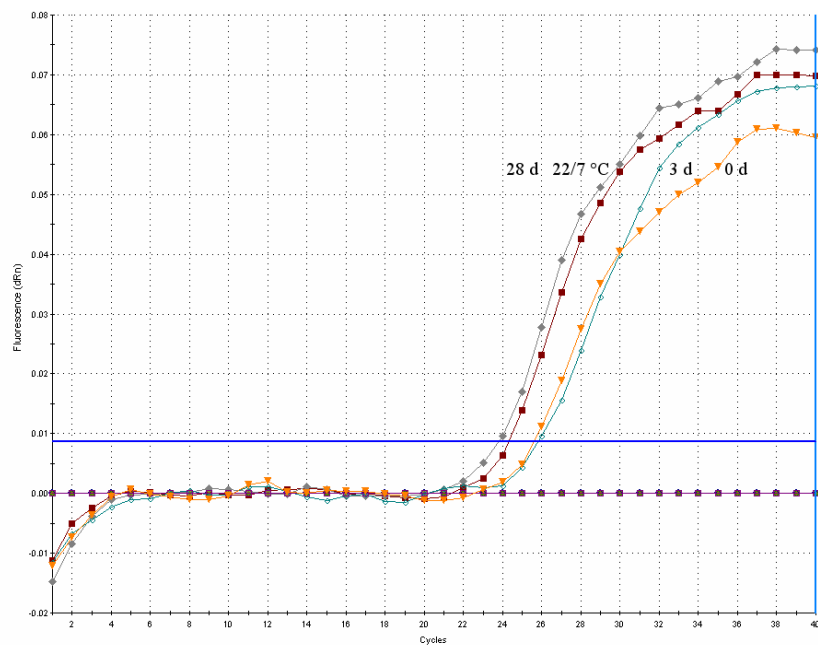
**Abbildung 31: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühnerembryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten**

Dargestellt ist der Nachweis von infektiösem Influenzavirus aus einer Rohwurstprobe nach 7 Tagen Reifung und Lagerung bei 22 °C. Die Infektion der Bruteier erfolgte mit der Verdünnungsstufe (Vs) von 1:5. Beide Embryonen waren Virus-negativ im HA-Test.





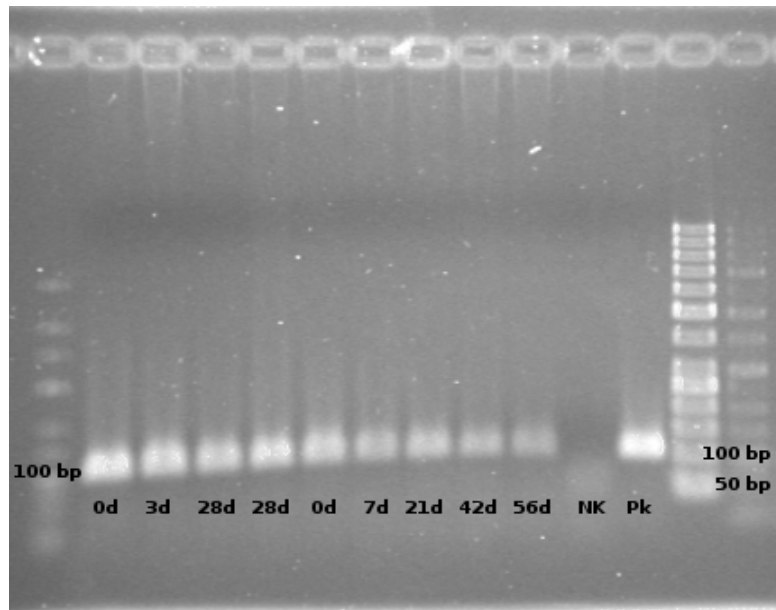
**Abbildung 32: Positiv- und Negativkontrolle des ECHO-Virusnachweis mittels real time RT- PCR in kurz- und langgereiften Rohwürsten**



**Abbildung 33: Nachweis von ECHO-Virus in kurzgereiften Rohwürsten – Amplifikationskurven der real time RT-PCR**

Dargestellt sind die Proben der Versuchstage: 28 d bei 22 °C und 7 °C, 3 d, 0 d.





**Abbildung 34: Amplifikationsprodukte der real time RT-PCR für ECHO-Virus in kurz- und langgereiften Rohwürsten**

Dargestellt sind die Proben der kurzgereiften Rohwürste von Tag 0, 3 und 28 sowie der langgereiften Rohwürste von Tag 0, 7, 21, 42, 56. Die Fragmentgröße beträgt 101 bp.

Tabelle 47: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit Natriumchlorid und Natriumnitrit

Gruppe	NaCl (%)/ NaNO <sub>2</sub> (ppm)	Zeit (h)	Temp.(°C)	TCID <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> /ml) Mittelwert aus n = 5	Standard- abweichung
1 (PBS)	0,8	3	4	8,25	0,306
2	2,0	3	4	8,20	0,326
3	6,0	3	4	8,10	0,224
4	12,0	3	4	8,35	0,285
5	20,0	3	4	8,30	0,209
6	2,0 / 100	3	4	8,15	0,225
7	2,0 / 150	3	4	8,05	0,371
8	2,0 / 200	3	4	8,05	0,481
Zeit (d)					
1	0,8	7	4	8,10	0,379
2	2,0	7	4	8,15	0,224
3	6,0	7	4	8,40	0,487
4	12,0	7	4	8,50	0,586
5	20,0	7	4	8,55	0,570
6	2,0 / 100	7	4	8,15	0,379
7	2,0 / 150	7	4	8,05	0,112
8	2,0 / 200	7	4	8,20	0,447
Zeit (h)					
1	0,8	3	20	8,10	0,487
2	2,0	3	20	8,25	0,395
3	6,0	3	20	8,15	0,379
4	12,0	3	20	8,20	0,412
5	20,0	3	20	8,00	0,250
6	2,0 / 100	3	20	8,10	0,285
7	2,0 / 150	3	20	8,25	0,530
8	2,0 / 200	3	20	8,25	0,433
Zeit (d)					
1	0,8	7	20	7,75	0,848
2	2,0	7	20	8,10	0,379
3	6,0	7	20	8,10	0,379
4	12,0	7	20	8,20	0,412
5	20,0	7	20	8,15	0,518
6	2,0 / 100	7	20	7,95	0,542
7	2,0 / 150	7	20	8,05	0,209
8	2,0 / 200	7	20	8,05	0,326

Tabelle 48: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit D/L-Milchsäure

Gruppen	D/L- Milchsäure	Zeit (h)	Temp. (°C)	TCID <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> /ml) Mittelwert aus n = 5	Standard- abweichung
1	0,10	3	4	8,30	0,326
2	0,15	3	4	8,30	0,370
3	0,20	3	4	8,50	0,250
4	0,30	3	4	8,40	0,418
5	0,40	3	4	8,35	0,137
6	0,00	3	4	8,00	0,000
Zeit (d)					
1	0,10	7	4	8,34	0,147
2	0,15	7	4	8,20	0,274
3	0,20	7	4	8,35	0,379
4	0,30	7	4	8,20	0,326
5	0,40	7	4	7,95	0,326
6	0,00	7	4	8,00	0,000
Zeit (h)					
1	0,10	3	20	8,25	0,177
2	0,15	3	20	8,35	0,418
3	0,20	3	20	8,25	0,433
4	0,30	3	20	8,15	0,379
5	0,40	3	20	8,10	0,224
6	0,00	3	20	8,00	0,000
Zeit (d)					
1	0,10	7	20	8,20	0,274
2	0,15	7	20	7,80	0,326
3	0,20	7	20	8,05	0,274
4	0,30	7	20	8,00	0,177
5	0,40	7	20	7,75	0,177
6	0,00	7	20	8,00	0,000

Tabelle 49: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit Salzsäure

Gruppen	pH eingestellt mit HCl analog zu MS	Zeit (h)	Temp. (°C)	TCID <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> /ml) Mittelwert aus n = 5	Standard- abweichung
1		3	4	8,37	0,177
2		3	4	8,50	0,354
3		3	4	8,00	0,000
4		3	4	8,38	0,177
5		3	4	8,38	0,177
6		3	4	8,00	0,000
Zeit (d)					
1		7	4	8,00	0,354
2		7	4	8,00	0,354
3		7	4	7,75	0,000
4		7	4	8,13	0,177
5		7	4	7,86	0,177
6		7	4	8,00	0,000
Zeit (h)					
1		3	20	8,36	0,530
2		3	20	8,25	0,354
3		3	20	8,25	0,000
4		3	20	8,36	0,177
5		3	20	8,25	0,354
6		3	20	8,00	0,000
Zeit (d)					
1		7	20	7,63	0,530
2		7	20	7,38	0,177
3		7	20	7,50	0,354
4		7	20	7,38	0,177
5		7	20	7,38	0,177
6		7	20	8,00	0,000

Tabelle 50: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit kurzgereiften Rohwürsten

Tag (= Gruppe)		TCID <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> /ml) Mittelwert aus n = 5	Standard- abweichung
0	22 °C	6,05 <sup>1</sup>	0,497
3	22 °C	5,55	0,274
7	22 °C	5,30*	0,274
	7 °C	5,40*	0,137
14	22 °C	5,45*	0,370
	7 °C	5,80	0,112
21	22 °C	4,65*	0,285
	7 °C	5,50	0,354
28	22 °C	4,00*	0,306
	7 °C	5,00*	0,000

1 n=10, \* statistisch signifikanter Unterschied gegenüber Tag 0

Tabelle 51: Influenzavirus H3N8 - mittlere infektiöse Dosen der Versuchsreihen mit Natriumchlorid

Gruppen	NaCl (%)	Zeit (d)	Temp. (°C)	Mittlere Ei-infektiöse Dosis (log <sub>10</sub> x 5 / ml)	
1	0,8 (PBS)	3	4	7,40	n = 5
2	2	3	4	7,33	6
3	6	3	4	7,17	6
4	12	3	4	6,17	6
Zeit (d)					n
1	0,8 (PBS)	7	4	6,50	2
2	2	7	4	7,50	2
3	6	7	4	7,00	2
4	12	7	4	5,50	2
Zeit (d)					n
1	0,8 (PBS)	10	4	6,67	4
2	2	10	4	5,75	4
3	6	10	4	5,25	4
4	12	10	4	2,75	4
Zeit (d)					n
1	0,8 (PBS)	3	20	7,00	5
2	2	3	20	5,83	6
3	6	3	20	5,67	6
4	12	3	20	3,67	6
Zeit (d)					n
1	0,8 (PBS)	7	20	6,50	2
2	2	7	20	7,00	2
3	6	7	20	5,00	2
4	12	7	20	2,50	2
Zeit (d)					n
1	0,8 (PBS)	10	20	5,67	4
2	2	10	20	5,00	4
3	6	10	20	0,50	4
4	12	10	20	n.n.	4

n.n.: kein infektiöses Virus nachweisbar

**Tabelle 52: Influenzavirus H3N8 - signifikante Ergebnisse der Versuchsreihe mit Natriumchlorid**

Mittels Mann-Whitney-Test untersuchte Variable: Infektiöse Dosis

Temperatur/ Zeit	Vergleich Gruppe	bei Zeit 3 d		bei Zeit 10 d	
<b>4 °C</b>	PBS – 2 %	-		-	
	PBS – 6 %	-		-	
	PBS – 12 %	0,032*		0,029*	
<b>20 °C</b>	PBS – 2 %	0,015*		-	
	PBS – 6 %	0,002*		0,029*	
	PBS – 12 %	0,004*		0,029*	
	<b>Vergleich Zeit</b>	<b>PBS</b>	<b>2 %</b>	<b>6 %</b>	<b>12 %</b>
<b>4 °C</b>	3d – 7d	-	-	-	-
	3d – 10d	-	0,005*	0,005*	0,005*
<b>20 °C</b>	3d – 7d	-	-	-	-
	3d – 10d	0,018*	-	0,010*	0,005*
	<b>Vergleich Temperatur</b>	<b>4 °C vs. 20 °C</b>			
<b>3 d</b>	PBS	-			
	2 %	0,011*			
	6 %	0,002*			
	12 %	0,004*			
<b>10 d</b>	PBS	-			
	2 %	-			
	6 %	0,029*			
	12 %	0,029*			

\* signifikanter Unterschied / - nicht signifikant (exakte Signifikanz 2-seitig mit  $p \leq 0,05$ )

**Tabelle 53: Influenzavirus H3N8 - mittlere infektiöse Dosen der Versuchsreihe mit kurzgereiften Rohwürsten**

Tag (= Gruppe)		Mittlere Ei-infektiöse Dosis (log <sub>10</sub> x 5 / ml)	Statistisch signifikanter Unterschied (Vergleich Temperatur)
0	22 °C	4,0	-
3	22 °C	n.n.	0,048*
	7 °C	1,8	
7	22 °C	n.n.	0,008*
	7 °C	1,0	
10	7 °C	0,8	0,008*
14	7 °C	0,35	0,008*

\*signifikanter Unterschied / - nicht signifikant (exakte Sign. 2-seitig mit  $p \leq 0,05$ )  
n.n.: kein infektiöses Virus nachweisbar

**Tabelle 54: Influenzavirus H5N6 - mittlere infektiöse Dosen der Versuchsreihen mit kurzgereiften Rohwürsten**

Tag (= Gruppe)		Mittlere Ei-infektiöse Dosis (log <sub>10</sub> x 5 / ml)	Statistisch signifikanter Unterschied (Vergleich Temperatur)
0	22 °C	3,6	-
1	22 °C	1,8	-
	7 °C	1,5	-
3	22 °C	1,5	-
	7 °C	1,2	-
7	22 °C	n.n.	0,008*
	7 °C	0,6	-
10	7 °C	0,1	-
14	7 °C	0,1	-
17	7 °C	n.n.	-

\*signifikanter Unterschied / - nicht signifikant (exakte Sign. 2-seitig mit  $p \leq 0,05$ )  
n.n.: kein infektiöses Virus nachweisbar



Tabelle 55: Methoden und Materialien/ Chemikalien für die chemische Untersuchung der Rohwürste

Methode nach LFGB § 64			Chemikalien	Geräte/ Material
<b>L 08.00-2</b>	1980-09	Messung des <b>pH-Wertes</b> in Wurstwaren		<u>pH- Meter</u> <i>pH 340 i</i> <i>WTW Weilheim</i>
<b>L 08.00-3</b>	2008-06	Bestimmung der <b>Trockenmasse</b> in Wurstwaren		Seesand- Quarzsand (0,4- 0,8 mm) <i>Firma Grüssing</i>  <u>Trockenschrank</u> <i>FD 240</i> <i>BINDER GmbH</i>
<b>L 08.00-6</b>	1980-09	Bestimmung des <b>Gesamtfettgehaltes</b> in Wurstwaren	Salzsäure <i>Carl Roth GmbH</i>  Petrolether (40- 60)	<u>Trockenschrank</u> <i>FD 240</i> <i>BINDER GmbH</i>  <u>Hydrolyseeinheit</u> <i>HY 16/6</i> <i>Firma Gerhardt</i> <i>GmbH &amp; Co. Kg</i>  <u>Soxtherm</u> <u>Multistat SX PC</u> <i>Firma Gerhardt</i> <i>GmbH &amp; Co. Kg</i>
<b>L 08.00-7</b>	2007-04	Bestimmung von <b>Rohprotein</b> in Wurstwaren	Kjel Tabs CX <i>Thomson &amp; Capper LTD,</i> <i>UK</i>  Schwefelsäure 98% <i>Carl Roth GmbH</i>	<u>Thermoblock</u>  <u>Turbosog</u>  <u>Vapodest 50</u>  <i>Firma Gerhardt</i> <i>GmbH &amp; Co. Kg</i>
<b>L 08.00-8</b>	1980-09	Bestimmung des <b>Hydroxyprolingehaltes</b> in Wurstwaren	L-Hydroxyprolin  Citronensäure-Monohydrat  NaOH- Plätzchen  Natriumacetat  Natriumethylmercuri-Thio- salcicylat  1- Propanol  2- Propanol	<u>Zinnfolie</u> <i>a &amp; p</i> <i>Instruments</i> <i>Detmold</i>  <u>Heizblock</u> <i>Kjeldatherm</i>  <u>Wasserbad</u> <i>Memmert GmbH</i> <i>&amp; Co. Kg</i>

# Anhang

			<p>Chloramin- T</p> <p>Perchlorsäure</p> <p>Petroleumbenzin (60-80)</p> <p>4- Dimethylamino- benzaldehyd</p> <p><i>Carl Roth GmbH</i></p>	<p><u>Spektralphoto- Meter</u></p> <p><i>SPEKOL 1200</i></p> <p><i>Analytik Jena</i></p> <p><i>AG</i></p>
<b>L 08.00-14</b>	2008-06	<p>Bestimmung des <b>Nitritgehaltes</b> in Wurstwaren, enzymatische Reduktion von Nitrat zu Nitrit, Spektralfotometrisches Verfahren</p>	<p>Bromthymolblau</p> <p>Ethanol 96%</p> <p>Sulfanylamid</p> <p>1- Naphtyl- Ethylen- Ammoniumdichlorid</p> <p>Natriumnitrit</p> <p>Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat</p> <p>Zinkacetat</p> <p>Essigsäure 96%</p> <p><i>Carl Roth GmbH</i></p>	<p><u>Spektralphoto- Meter</u></p> <p><i>SPEKOL 1200</i></p> <p><i>Analytik Jena</i></p> <p><i>AG</i></p> <p><u>Homogenisator</u></p> <p><i>Ultra Turax T25</i></p> <p><i>KIKA Labortech.</i></p>
<b>L 08.00-17</b>	1981-11	<p>Bestimmung von <b>L- und D-Milchsäure</b> (L- und D-Lactat) in Wurstwaren</p>		<p>Kit</p> <p>D- Milchsäure</p> <p><u>L- Milchsäure</u></p> <p><i>Enzymatische</i></p> <p><i>BioAnalytik</i></p> <p><i>R- Biopharm AG</i></p>
<b>L 06.00-5</b>	1980-09	<p>Bestimmung des <b>Kochsalzgehaltes</b> in Wurstwaren</p>	<p>Kaliumhexacyanoferrat(II) Trihydrat</p> <p>Zinkacetat</p> <p>Essigsäure 96%</p> <p>Kaliumchromat</p> <p>Silbernitrat</p> <p><i>Carl Roth GmbH</i></p>	<p><u>Wasserbad</u></p> <p><i>Memmert GmbH</i></p> <p><i>&amp; Co. Kg</i></p>

Tabelle 56: Methoden und Materialien/ Chemikalien zur mikrobiologischen Untersuchung der Rohwürste

Methode nach LFGB § 64			Material	Nährböden
<b>L 08:00-37</b>	1992-06	Bestimmung der <b>aeroben Keimzahl</b> bei 30 °C in Wurstwaren; Spatelverfahren (Referenzverfahren)	Katalase (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )  Oxidase Reagenz (1% Naphtol Lösung, 1% N-N-Dimethyl-1,4-phenylendiammoniumchlorid)  <i>Carl Roth GmbH</i>	Fertig- Agar  <u>PC- Agar</u> <i>Firma Sifin</i>  <u>DHL- Agar</u> <i>Firma Merck</i>
<b>L 08.00-41</b>	1992-12	Bestimmung der aerob wachsenden <b>Milchsäurebakterien</b> in Wurstwaren		<u>MRS- Agar</u> <i>Firma Sifin</i>

Tabelle 57: Rezeptur zur PBS- Herstellung

Rezeptur <b>PBS</b> mit / ohne NaCl  pH 7,4	Aqua dest.: 1000 ml Natriumchlorid (NaCl): 8,00 g Kaliumchlorid (KCl): 0,20g Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O): 1,15 g Monokaliumphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ): 0,20 g Calciumchlorid (CaCl): 0,10g Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O): 0,10 g
--	--

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der vom Robert Koch-Institut erfassten meldepflichtigen Infektionserkrankungen für ausgewählte Erreger.....	3
Tabelle 2: Von Deutschland an die EFSA gemeldete lebensmittelbedingte Krankheitsausbrüche für das Jahr 2006.....	4
Tabelle 3: Übersicht lebensmittelassoziierter viraler Gastroenteritisfälle in der EU.....	5
Tabelle 4: Übersicht zu Vertretern der „Food borne viruses“.....	6
Tabelle 5: Übersicht zu Serotypen humaner Enteroviren.....	10
Tabelle 6: Funktion verschiedener Proteine von Enteroviren.....	11
Tabelle 7: Übersicht zu Erkrankungen hervorgerufen durch humane Enteroviren .....	13
Tabelle 8: Ergebnisse der Enterovirus-Surveillance in Deutschland, (Stand vom 29.01.2009) .....	14
Tabelle 9: Übersicht zu Tenazitätsstudien mit humanen Enteroviren.....	15
Tabelle 10: Übersicht zu Influenzavirus-Subtypen und ihren Wirtsspezies .....	17
Tabelle 11: Funktion verschiedener Proteine von Influenza A-Viren .....	18
Tabelle 12: Übersicht der beim Menschen durch niedrigpathogene aviäre Influenzaviren verursachten Infektionen.....	22
Tabelle 13: Übersicht zu Tenazitätsstudien mit aviären Influenzaviren.....	26
Tabelle 14: Zielvorgaben für Wasseraktivitäts- und pH-Wert von Rohwurstendprodukten ...	30
Tabelle 15: Übersicht Geräte, Laborbedarf, Reagenzien, Kits .....	34
Tabelle 16: Übersicht der für die RT-PCR verwendeten Primer und Sonde.....	39
Tabelle 17: Gesamtübersicht zu den durchgeführten Versuchsreihen.....	39
Tabelle 18: Übersicht verwendeter Konzentrationen an Natriumchlorid, Natriumnitrit und D/L-Milchsäure sowie eingesetzter Virustiter für die Durchführung der <i>in vitro</i> -Versuchsreihen .....	40
Tabelle 19: Grundrezeptur zur Herstellung der Rohwürste .....	43
Tabelle 20: Reifung und Lagerung kurzgereifter Rohwürste der Versuchsreihe mit ECHO-Virus.....	44
Tabelle 21: Reifung und Lagerung langereifter Rohwürste der Versuchsreihe mit ECHO-Virus.....	44
Tabelle 22: Reifung und Lagerung von kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit Influenzavirus H3N8 und H5N6.....	44

Tabelle 23: Probennahmetage für die virologische, mikrobiologische und physikalische Untersuchung.....	45
Tabelle 24: Versuchsgruppen in Studien zum Einfluss von Natriumchlorid und Natriumnitrit auf ECHO-Virus .....	50
Tabelle 25: pH- und aw-Werte der Natriumchlorid-Versuchsreihe mit ECHO-Virus .....	51
Tabelle 26: Versuchsgruppen in Versuchsreihen zum Einfluss von D/L-Milchsäure auf ECHO-Virus .....	52
Tabelle 27: pH-Werte der Milchsäure- und Salzsäurelösungen der Versuchsreihen mit ECHO-Virus .....	54
Tabelle 28: Versuchsgruppen in Studien zum Einfluss von Natriumchlorid auf Influenzavirus H3N8.....	55
Tabelle 29: Versuchsgruppen in Studien zum Einfluss von D/L- Milchsäureversuchsreihe auf Influenzavirus H3N8.....	57
Tabelle 30: Nachweisbarkeit von infektiösem Influenzavirus im Brutei .....	58
Tabelle 31: Mittlere Virustiter in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit ECHO-Virus.....	60
Tabelle 32 : Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen in Versuchsreihen mit ECHO-Virus.....	62
Tabelle 33 : Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihe mit ECHO-Virus, Reifung und Lagerung bei 7 °C.....	62
Tabelle 34: Ergebnisse der chemischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihe mit ECHO-Virus, Reifung und Lagerung bei 22 °C.....	63
Tabelle 35: Probenmenge und mittlere Virustiter in langgereiften Rohwürsten in Versuchsreihen mit ECHO-Virus.....	66
Tabelle 36: Zusammensetzung langgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit ECHO-Virus .....	67
Tabelle 37: Ergebnisse der chemischen Untersuchung langgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit ECHO-Virus.....	68
Tabelle 38: Probennahmetage für die virologische, mikrobiologische, chemische Untersuchung und Nachweis der Infektiosität des H3N8- und H5N6-Virus im Brutei.....	69
Tabelle 39: Zusammensetzung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus .....	71

Tabelle 40: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus, Lagerung und Reifung bei 7 °C .....	72
Tabelle 41: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchungen kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus, Lagerung und Reifung bei 22 °C .....	72
Tabelle 42: Zusammensetzung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H5N6-Virus .....	73
Tabelle 43: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H5N6-Virus, Reifung und Lagerung bei 7 °C .....	73
Tabelle 44: Ergebnisse der chemischen und mikrobiologischen Untersuchung kurzgereifter Rohwürste der unbeimpften Kontrollchargen der Versuchsreihen mit dem H5N6-Virus, Reifung und Lagerung bei 22°C.....	74
Tabelle 45: Übersicht zum Einfluss der Temperatur auf die Tenazität verschiedenen Viren	93
Tabelle 46: Auswertung der Befunde der infizierten Bruteier .....	117
Tabelle 47: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit Natriumchlorid und Natriumnitrit .....	122
Tabelle 48: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit D/L-Milchsäure .....	123
Tabelle 49: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit Salzsäure .....	124
Tabelle 50: ECHO-Virustiter der Versuchsreihe mit kurzgereiften Rohwürsten.....	125
Tabelle 51: Influenzavirus H3N8 - mittlere infektiöse Dosen der Versuchsreihen mit Natriumchlorid.....	126
Tabelle 52: Influenzavirus H3N8 - signifikante Ergebnisse der Versuchsreihe mit Natriumchlorid.....	127
Tabelle 53: Influenzavirus H3N8 - mittlere infektiöse Dosen der Versuchsreihe mit kurzgereiften Rohwürsten.....	128
Tabelle 54: Influenzavirus H5N6 - mittlere infektiöse Dosen der Versuchsreihen mit kurzgereiften Rohwürsten .....	128
Tabelle 55: Methoden und Materialien/ Chemikalien für die chemische Untersuchung der Rohwürste.....	129
Tabelle 56: Methoden und Materialien/ Chemikalien zur mikrobiologischen Untersuchung der Rohwürste.....	131
Tabelle 57: Rezeptur zur PBS- Herstellung .....	131

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: CAS Methode (chorioallantoic sac) zur Beimpfung embryonierter Hühnereier (nach SPACKMAN et al. 2008) .....	36
Abbildung 2: Formel zur Berechnung der EID <sub>50</sub> .....	38
Abbildung 3: Befüllung des Kutters mit vorzerkleinertem Rohfleisch zu Beginn des Kutterprozesses .....	42
Abbildung 4: Streichfähiges Wurstbrät am Ende des Kutterprozesses .....	42
Abbildung 5: Formel zur Berechnung der Gesamtkeimzahl als KbE/g .....	46
Abbildung 6: Mittlere ECHO-Virustiter nach 7 Tagen in Abhängigkeit von Natriumchlorid-/ Natriumnitrit-konzentration und Temperatur .....	51
Abbildung 7: Mittlerer ECHO-Virustiter nach 7 Tagen in Abhängigkeit der Milchsäurekonzentration und Temperatur .....	53
Abbildung 8: Mittlere ECHO-Virustiter nach 7 Tagen in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur .....	54
Abbildung 9: Einfluss verschiedener Natriumchloridkonzentrationen auf des Influenzavirus H3N8, bei einer Expositionstemperatur von 4 °C .....	56
Abbildung 10: Einfluss verschiedener Natriumchloridkonzentrationen auf das Influenzavirus H3N8, bei einer Expositionstemperatur von 20 °C .....	57
Abbildung 11: Langgereifte Rohwürste in der Reifekammer .....	60
Abbildung 12: Verlauf der ECHO-Virustiter in kurzgereiften Rohwürsten in Abhängigkeit von Reife- und Lagerungstemperatur .....	61
Abbildung 13: Verlauf des pH-Werts in kurz- und langgereiften Würsten in Versuchsreihen mit ECHO-Virus in Abhängigkeit von Lagerungs- und Reifetemperatur .....	63
Abbildung 14: Verlauf der a <sub>w</sub> -Werte in kurz- und langgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit ECHO-Virus in Abhängigkeit von Lagerungs- und Reifungstemperatur .....	64
Abbildung 15: Keimzahlverlauf in kurz- und langgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit ECHO-Virus in Abhängigkeit von Lagerungs- und Reifungstemperatur .....	65
Abbildung 16: Verlauf mittlerer ECHO-Virustiter in langgereiften Rohwürsten .....	67
Abbildung 17: Verlauf der mittleren infektiösen Dosis in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihen mit Influenzavirus H3N8 in Abhängigkeit von Reife- und Lagerungstemperatur .....	70
Abbildung 18: Verlauf der mittleren infektiösen Dosis in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit dem Influenzavirus H5N6 in Abhängigkeit von Reife- und Lagerungstemperatur .....	71

Abbildung 19: pH- Wertverläufe in kurzgereiften Rohwürsten in Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus.....	72
Abbildung 20: $a_w$ -Wertverläufe in kurzgereiften Rohwürsten in Versuchsreihen mit dem H3N8-Virus und H5N6-Virus, Lagerung und Reifung bei 7 °C.....	73
Abbildung 21: pH-Wertverläufe in kurzgereiften Rohwürsten in versuchsreihen mit dem H5N6-Virus.....	74
Abbildung 22: Nachweis von ECHO-Virus in langgereiften Rohwürsten - Amplifikationskurven der real time RT-PCR.....	75
Abbildung 23: Nachweis von Influenza A-Virus in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit dem H3N8-Virus – Amplifikationskurven der real time RT-PCR.....	75
Abbildung 24: Nachweis von Influenza A-Virus in kurzgereiften Rohwürsten der Versuchsreihe mit dem H5N6-Virus – Amplifikationskurven der real time RT-PCR.....	76
Abbildung 25: BGM- Zellkultur.....	116
Abbildung 26: Makroskopische Besichtigung von Hühnerembryonen aus mit Influenzavirus infizierten Bruteiern .....	116
Abbildung 27: Exemplarischer Nachweis von Influenza A-Virus in Allantoisflüssigkeit infizierter Bruteier aus den Versuchsreihen mit dem H3N8- Virus – Amplifikationskurven der real time RT-PCR.....	117
Abbildung 28: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühnerembryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten .....	118
Abbildung 29: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühneremryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten .....	118
Abbildung 30: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühneremryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten .....	119
Abbildung 31: Infektiösitätsnachweis von Influenzavirus im Brutei: Hühneremryonen aus der Versuchsreihe mit H5N6-Virus in kurzgereiften Rohwürsten .....	119
Abbildung 32: Positiv- und Negativkontrolle des ECHO-Virusnachweis mittels real time RT-PCR in kurz- und langgereiften Rohwürsten.....	120
Abbildung 33: Nachweis von ECHO-Virus in kurzgereiften Rohwürsten – Amplifikationskurven der real time RT-PCR.....	120
Abbildung 34: Amplifikationsprodukte der real time RT-PCR für ECHO-Virus in kurz- und langgereiften Rohwürsten.....	121



## **Danksagung**

An dieser Stelle soll nun all denjenigen gedankt werden, durch deren Mitwirkung und Unterstützung diese Arbeit realisiert werden konnte. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Professor Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung und wissenschaftliche Betreuung dieser Promotionsarbeit. Ebenfalls für die Bereitstellung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Karsten Fehlhaber danken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich weiterhin bei dem „FEI- Team“:

- bei meinen beiden Betreuern Frau Dr. Jill Manteufel und Herrn Dr. Thiemo Albert für ihre fachliche und persönliche Betreuung der Arbeit sowie für die Unterstützung und Hilfe bei allen Fragen und Problemen
- bei meiner Kollegin und Mitstreiterin Janin Heinze für die gegenseitige Unterstützung und gemeinsame Bewältigung aller Höhen und Tiefen im Verlauf dieser Arbeit
- bei Nadine Roßner für die tatkräftige und unermüdliche Unterstützung im Labor sowie bei Anouska Bori für ihre Mithilfe

Weiterer Dank gilt:

- Frau Nadja Leinecker für ihre Hilfe in sämtliche Fragen und Problemen des Laboralltags und die Betreuung der „ersten Schritte“ im Labor
- den Mitarbeitern des Institutes für Tierhygiene und Öffentlichem Veterinärwesen für Ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre, besonderer Dank an Frau Monika Schneider
- meinen Mitdoktoranden für die geistige und moralische Unterstützung, mit besonderem Dank an Anika Friese, Andreas Sommerfeld und Katja Roth

Ebenso möchte ich mich bedanken bei:

- Herrn Andreas Richter für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Arbeit
- der Firma Schafft in Ansbach für die Bereitstellung von Versuchsmaterialien

Diese Arbeit ist Teil eines Vorhabens, welches aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie) via AiF über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. gefördert wurde.

AiF – Projekt Nr. AiF- FV 15189 BR